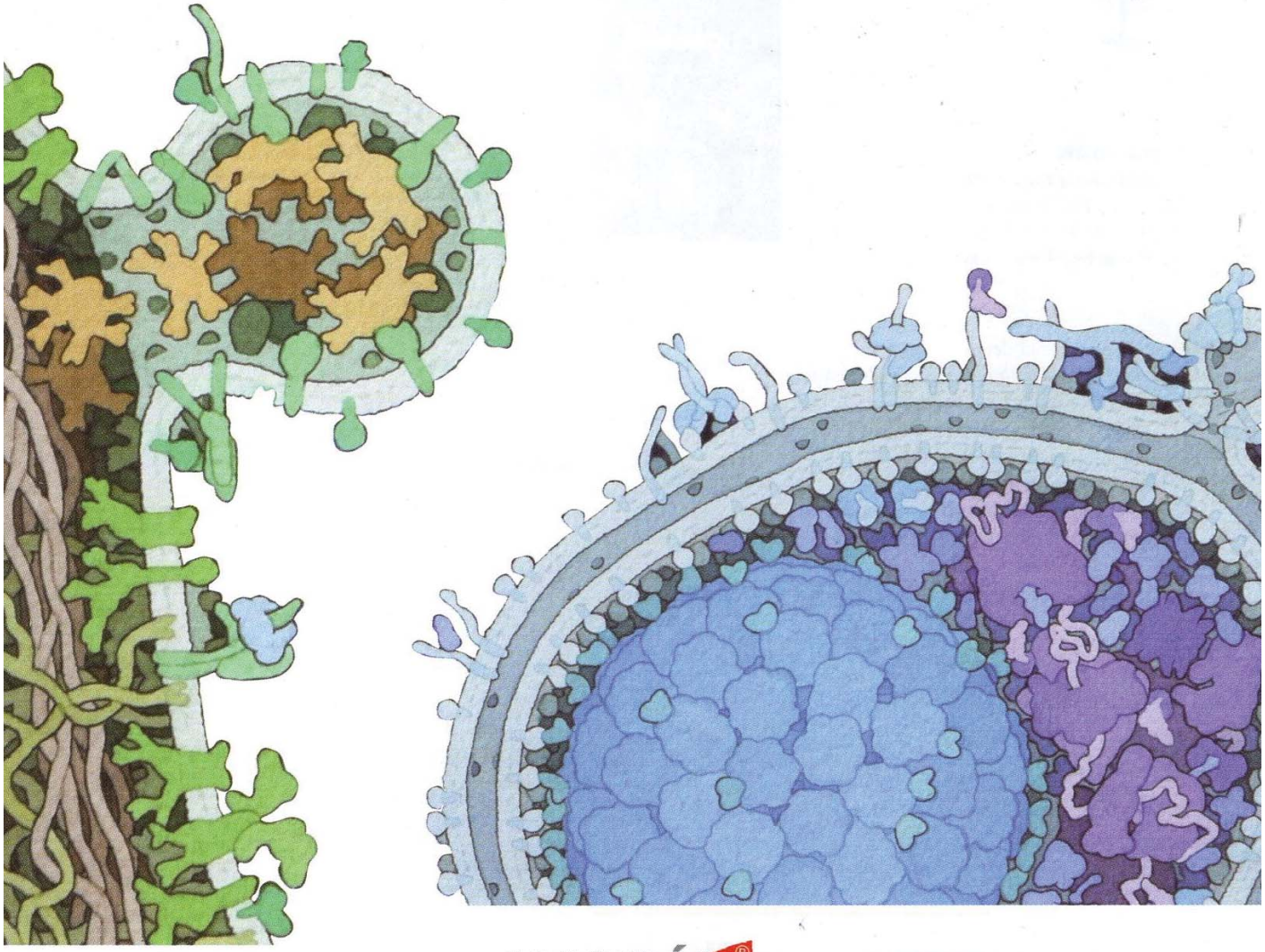
Cooper & Hausman

LA CÉLULA

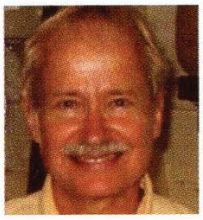
séptima edición



MARBÁN®

Los autores

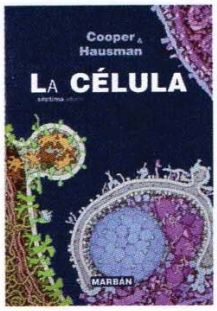
Geoffrey M. Cooper es Profesor y Jefe (*chair*) del Departamento de Biología en la Universidad de Boston. En 1973 se doctoró en Bioquímica en la Universidad de Miami, realizó la tesis doctoral con Howard Temin en la Universidad de Wisconsin, donde desarrolló ensayos de transferencia genética para detectar el ADN proviral del virus del sarcoma de Rous y los retrovirus relacionados. En 1975 ingresó en la facultad del *Dana-Farber Cancer Institute* y en la *Harvard Medical School*, ampliando esos estudios hacia la identificación de los oncogenes en tumores humanos. Desde su llegada a la Universidad de Boston en 1998, el Dr. Cooper ha empleado *La Célula* para sus clases de biología celular, también ha continuado sus investigaciones y participado en la importante expansión de la biociencia. Las investigaciones del Dr. Cooper se centran en el entendimiento de las funciones de las proteínas de los oncogenes en las vías de señalización que regulan la proliferación celular y la muerte celular programada. Ha publicado dos libros sobre cáncer y más de 100 artículos de investigación acerca de señalización celular y cáncer.



Robert E. Hausman es Profesor y Director (*graduate director*) del Departamento de Biología en la Universidad de Boston. Obtuvo el doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Northwestern en 1971, realizando la tesis doctoral junto a Aron Moscona en la Universidad de Chicago, donde investigó las interacciones célula-célula en las primeras fases del desarrollo embrionario y descubrió una de las moléculas de adhesión celular. En el año 1978 amplió sus investigaciones sobre las interacciones de la superficie celular en el desarrollo muscular y la regulación de la expresión genética en el desarrollo del sistema nervioso mediante contacto célula a célula. Ha sido profesor de biología celular y ha impartido cursos de especialización en la Universidad de Boston. Actualmente los profesores Cooper y Hausman imparten juntos biología celular. Su trabajo se centra en el entendimiento de cómo las interacciones celulares y entre células y la matriz extracelular afectan a la diferenciación y a la morfogénesis. El Dr. Hausman falleció pocos días después de finalizar la producción de esta 7.ª edición.

FOMENTA LA CREATIVIDAD
RESPETA EL DERECHO DE AUTOR

© **2017.** *7ª ed.*
© 2014, 2012, 2011, 2010
© **MARBÁN**
Joaquín María López, 72
28015 Madrid. España
Teléf.: (34) 91 543 55 55
www.marbanlibros.com



La cubierta
La imagen de la cubierta es una ilustración a acuarela que muestra las fases más importantes de la apoptosis (desarrollado en el Capítulo 17). Para una descripción más detallada de la imagen de la cubierta consultar página xiii.

El artista
David S. Goodsell es Profesor Asociado de Biología Molecular en el Scripps Research Institute. Sus libros ilustrados, The Machinery of Life y Our Molecular Nature, exploran las moléculas biológicas y los distintos papeles que desempeñan en las células vivas. Su nuevo trabajo: Bionanotechnology: Lessons from Nature, presenta la creciente conexión entre biología y nanotecnología. Se puede encontrar más información en:
http://mgl.scripps.edu/people/goodsell

Edición en español de:
The Cell: a Molecular Approach, 7th edition
Geoffrey M. Cooper and Robert E. Hausman

Este libro está dedicado a Spenser,
gracias por tantos años de compañía y apoyo
G.M.C

Edición original
© Sinauer Associates, Inc.
Translated and published by arrangement
with Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA

Traducción: **Dra. N. Wright**
Centro de Investigaciones Biológicas
Madrid, España

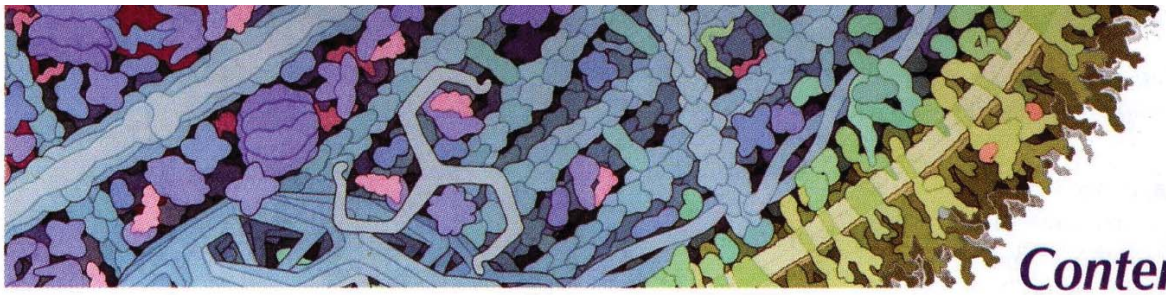
Fotocopiar es un delito (Art. 270 C.P.)

Este libro está legalmente protegido por los derechos de propiedad intelectual. Cualquier uso, fuera de los límites establecidos por la legislación vigente, sin el consentimiento del editor, es ilegal. Esto se aplica en particular a la fotocopia y, en general, a la reproducción en cualquier otro soporte.

MARBÁN® es marca registrada.
La fotocopia o el uso de productos protegidos bajo una marca registrada ® constituye delito tipificado en el artículo 274 C.P. que protege el derecho de propiedad industrial.

ISBN: 978-84-17184-54-4 (**MARBÁN** - Edición en español)
ISBN: 978-1-60535-290-9 -2015 (Sinauer Associates - Edición en inglés)

D.L.: M-1402-2017
Impreso en España. *Printed in Spain*



Contenido

SECCIÓN I PRINCIPIOS BÁSICOS

1 Visión global de la célula e investigación celular 3

Origen y evolución de las células 4
La primera célula 4
Evolución del metabolismo 6
Procariotas actuales 8
Células eucariotas 9
El origen de los eucariotas 10
Desarrollo de organismos multicelulares 13

Células como modelos experimentales 17
E. coli 17
Levaduras 18
Caenorhabditis elegans 18
Drosophila melanogaster 19
Arabidopsis thaliana 19
Vertebrados 20

Instrumentos de la biología celular 22
Microscopia óptica 22
Microscopia electrónica 28
Microscopia de superresolución óptica 32
Separación subcelular 33
Crecimiento de las células animales en cultivo 36
Cultivo de células vegetales 39
Virus 40

EXPERIMENTO CLAVE:
Cultivo celular animal 37
MEDICINA MOLECULAR:
Virus y cáncer 41
Resumen y palabras clave 43
Preguntas 45
Bibliografía 46

2 Moléculas y membranas 47

Moléculas de las células 47
Carbohidratos 48
Lípidos 50
Ácidos nucleicos 54
Proteínas 56

Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos 62
Actividad catalizadora de las enzimas 62
Mecanismos de catálisis enzimática 63
Coenzimas 67
Regulación de la actividad enzimática 68

Membranas celulares 70
Lípidos de membrana 70
Proteínas de membrana 71
Transporte a través de membranas celulares 73

EXPERIMENTO CLAVE:
Plegamiento de las cadenas polipeptídicas 58
EXPERIMENTO CLAVE:
Estructura de las membranas celulares 74
Resumen y palabras clave 77
Preguntas 78
Bibliografía 79

3 Bioenergía y metabolismo 81

Energía metabólica y ATP 81
Energía libre y ATP 81
Glicólisis y el ciclo de Krebs 84
Producción de energía a partir de lípidos 87

Transporte de electrones y fosforilación oxidativa 89
Cadena de transporte de electrones 89
Acoplamiento quimiosmótico 91

Fotosíntesis 95
Transporte de electrones 96
Síntesis de ATP 98
Síntesis de glucosa 99

Biosíntesis de los componentes celulares 101
Carbohidratos 101
Lípidos 102
Proteínas 103
Ácidos nucleicos 106

EXPERIMENTO CLAVE:
Teoría quimiosmótica 92
EXPERIMENTO CLAVE:
Antimetabolitos y quimioterapia 105
Resumen y palabras clave 107
Preguntas 108
Bibliografía 109

4 *Fundamentos de biología molecular 111*

Herencia, genes y ADN 111
Genes y cromosomas 111
Genes y enzimas 113
Identificación del ADN como el material genético 115
Estructura del ADN 116
Replicación del ADN 117

Expresión de la información genética 118
Colinealidad de genes y proteínas 119
Papel del ARN mensajero 120
Código genético 121
Virus ARN y transcripción inversa 123
ADN recombinante 124
Endonucleasas de restricción 126
Generación de moléculas de ADN recombinante 128
Vectores para ADN recombinante 129
Secuenciación de ADN 132
Expresión de genes clonados 134

Detección de ácidos nucleicos y proteínas 135
Amplificación de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa 135
Hibridación de ácidos nucleicos 137
Sondas de anticuerpos para proteínas 140
Función de los genes en eucariotas 141
Transferencia de genes en plantas y animales 142
Mutagénesis de ADN clonados 144
Introducción de mutaciones en genes celulares 146
Ingeniería genómica mediante el sistema CRISPR/Cas 147
Interferencia con la expresión génica celular 149

EXPERIMENTO CLAVE:
Hipótesis del provirus de ADN 125
EXPERIMENTO CLAVE:
Interferencia del ARN 150
Resumen y palabras clave 153
Preguntas 155
Bibliografía 156

5 *Genómica, proteómica y biología de sistemas 157*

Genomas y transcriptomas 157
Los genomas de las bacterias y las levaduras 158
Los genomas de *Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster y Arabidopsis thaliana* 158
Genoma humano 160
Genomas de otros vertebrados 160
Secuenciación de la siguiente generación y genomas personales 164
Análisis global de la expresión génica 166

Proteómica 167
Identificación de las proteínas de la célula 167
Análisis global de localización de proteínas 170
Interacciones entre proteínas 171

Biología de sistemas 173
Análisis sistemático de la función génica 174
Regulación de la expresión génica 175
Redes 176
Biología sintética 178

EXPERIMENTO CLAVE:
Genoma humano 161
MEDICINA MOLECULAR:
Malaria y biología sintética 180
Resumen y palabras clave 181
Preguntas 183
Bibliografía 183

SECCIÓN II FLUJO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

6 *Genes y genomas 187*

La estructura de los genes eucariotas 187
Intrones y exones 189
Función de los intrones 193

Secuencias no codificantes 194
Noncoding RNAs 196
Secuencias de ADN repetitivas 197
Duplicación génica y pseudogenes 201

Cromosomas y cromatina 204
Cromatina 204
Centrómeros 208
Telómeros 213

EXPERIMENTO CLAVE:
Descubrimiento de los intrones 190
EXPERIMENTO CLAVE:
El proyecto ENCODE 195
Resumen y palabras clave 214
Preguntas 215
Bibliografía 216

7 *Replicación, mantenimiento y reorganización del ADN genómico 217*

Replicación del ADN 217
ADN polimerasas 218
Horquilla de replicación 219
Fidelidad de replicación 226
Orígenes e iniciación de la replicación 227
Telómeros y telomerasa: el mantenimiento de los extremos de los cromosomas 230

Reparación del ADN 231
Inversión directa del ADN dañado 233
Reparación por escisión 235
Reparación por escisión de bases 236
Reparación por escisión de nucleótidos 236
Reparación acoplada a la transcripción 239
Reparación no complementaria 239
Síntesis de ADN translesión 242
Reparación de roturas de doble hebra 242

Reorganización del ADN 244
Tipos de apareamiento en levaduras 245
Genes de anticuerpos 246
Amplificación génica 254

MEDICINA MOLECULAR:
Cáncer de colon y reparación del ADN 241
EXPERIMENTO CLAVE:
Reorganización de los genes de inmunoglobulinas 248
Resumen y palabras clave 256
Preguntas 257
Bibliografía 258

8 *Síntesis y maduración del ARN 259*

Transcripción en bacterias 259
ARN polimerasa y transcripción 260
Control negativo de la transcripción y represores 262
Control positivo de la transcripción 265

ARN polimerasas eucariotas y factores de transcripción generales 265
ARN polimerasas eucarióticas 265
Factores de transcripción generales e iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II 266
Transcripción por las ARN polimerasas I y III 270

Regulación de la transcripción en eucariotas 271
Secuencias de regulación en *cis*: promotores y estimulares 272
Sitios de unión para factores de transcripción 276
Proteínas de regulación transcripcional 278
Estructura y función de los activadores de la transcripción 280
Represores eucarióticos 282
Regulación de la elongación 283

Cromatina y epigenética 284
Modificaciones de histonas 284
Factores remodeladores de la cromatina 288
Histonas y herencia epigenética 289
Metilación del ADN 292
ARN no codificantes 294

Maduración y renovación del ARN 295
Maduración de los ARN ribosómicos y de transferencia 295
Maduración del ARNm en eucariotas 297
Mecanismos de corte y empalme o *splicing* 299
Corte y empalme alternativo 306
Corrección del ARN 308
Degradación del ARN 309

EXPERIMENTO CLAVE:
Aislamiento de un factor de transcripción eucariótico 279
EXPERIMENTO CLAVE:
Descubrimiento del RNPsn 304
Resumen y palabras clave 311
Preguntas 313
Bibliografía 314

9 *Síntesis de proteínas, procesamiento y regulación 317*

Traducción del ARNm 317
ARN de transferencia 318
Ribosoma 319
Organización de los ARN mensajeros e inicio de la traducción 324
Mecanismo de la traducción 326
Regulación de la traducción 332

Plegamiento y procesamiento de proteínas 338
Chaperonas y plegamiento de proteínas 338
Enfermedades por defecto de plegamiento de proteínas 341
Enzimas que catalizan el plegamiento proteico 343
Escisión de proteínas 344
Glicosilación 346
Anclaje de lípidos 347

Regulación de la función de las proteínas 350
Regulación por pequeñas moléculas 350
Fosforilación de proteínas 351
Interacciones proteína-proteína 356

Degradación de proteínas 357
Vía de la ubiquitina-proteasoma 357
Proteólisis lisosómica 358

MEDICINA MOLECULAR:
Enfermedad de Alzheimer 342
EXPERIMENTO CLAVE:
El descubrimiento de las tirosina-quinasas 353
Resumen y palabras clave 360
Preguntas 361
Bibliografía 362

10 *Núcleo 367*

Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma 367
Estructura de la envuelta nuclear 367
Complejo del poro nuclear 372
Transporte selectivo de proteínas desde y hacia el núcleo 373
Transporte de ARN 377
Regulación del transporte de proteínas al núcleo 380

Organización de cromosomas 381
Territorios cromosómicos 381
Localización de cromatina y actividad transcripcional 382
Fábricas de replicación y transcripción 384

Cuerpos nucleares 386
El nucléolo y el ARNr 387
Cuerpos Polycomb: centros de represión transcripcional 391
Cuerpos de Cajal y motas: procesamiento y almacenamiento de RNPsn 391

MEDICINA MOLECULAR:
Enfermedades de la lámina nuclear 370
EXPERIMENTO CLAVE:
Identificación de las señales de localización nuclear 374
Resumen y palabras clave 393
Preguntas 394
Bibliografía 395

11 *Distribución y transporte de proteínas: retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas 397*

Retículo endoplásmico 397
Retículo endoplásmico y secreción de proteínas 398
Marcaje de las proteínas para dirigirse al retículo endoplásmico 400
Inserción de las proteínas en la membrana del RE 405
Plegamiento y procesamiento de las proteínas en el RE 411
Control de calidad en el RE 413
RE liso y síntesis de lípidos 416
Exportación de proteínas y lípidos desde el RE 420

Aparato de Golgi 421
Organización del Golgi 421
Glicosilación de proteínas en el Golgi 423
Metabolismo de lípidos y de polisacáridos en el Golgi 426
Distribución y exportación de proteínas desde el aparato de Golgi 427

Mecanismo de transporte de las vesículas 430
Aproximaciones experimentales al conocimiento del transporte de las vesículas 430
Selección de la mercancía, proteínas de la cubierta y gemación vesicular 431
Fusión de las vesículas 435

Lisosomas 436
Hidrolasas lisosómicas ácidas 436
Endocitosis y formación del lisosoma 438
Fagocitosis y autofagia 440
EXPERIMENTO CLAVE:
Hipótesis de la señal 402
MEDICINA MOLECULAR:
Enfermedad de Gaucher 437
Resumen y palabras clave 441
Preguntas 443
Bibliografía 444

12 *Mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas 447*

Mitocondrias 447
Organización y función de las mitocondrias 448
Sistema genético de las mitocondrias 450
Internalización de proteínas y formación de las mitocondrias 453
Lípidos mitocondriales 457
Transporte de metabolitos a través de la membrana interna 457

Cloroplastos y otros plástidos 458
Estructura y función de los cloroplastos 459
Genoma del cloroplasto 461
Internalización y distribución de las proteínas del cloroplasto 462
Otros plástidos 465

Peroxisomas 466
Funciones de los peroxisomas 468
Formación del peroxisoma 470

MEDICINA MOLECULAR:
Enfermedades de las mitocondrias: neuropatía óptica hereditaria de Leber 452
MEDICINA MOLECULAR:
Trastornos de la biogénesis de los peroxisomas 472
Resumen y palabras clave 475
Preguntas 476
Bibliografía 477

13 *Citoesqueleto y movimiento celular 479*

Estructura y organización de los filamentos de actina 479
Ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina 480
Organización de los filamentos de actina 484
Asociación de los filamentos de actina con la membrana plasmática 486
Microvellosidades 489
Protrusiones de la superficie celular y movimiento de las células 490

Motores de miosina 493
Contracción muscular 493
Asociaciones contráctiles de actina y miosina en células no musculares 498
Miosinas no convencionales 500

Microtúbulos 501
Estructura y organización dinámica de los microtúbulos 501
Ensamblaje de microtúbulos 505
Organización de los microtúbulos en las células 506

Motores microtubulares y movimientos 508
Proteínas motoras microtubulares 508
Transporte de mercancías y organización intracelular 512
Cilios y flagelos 514
Reorganización de los microtúbulos durante la mitosis 517
Movimiento cromosómico 518

Filamentos intermedios 519
Proteínas de los filamentos intermedios 520
Ensamblaje de los filamentos intermedios 521
Organización intracelular de los filamentos intermedios 522
Funciones de los filamentos intermedios: queratinas y enfermedades de la piel 525

EXPERIMENTO CLAVE:
Aislamiento de la quinesina 509
EXPERIMENTO CLAVE:
La expresión de una queratina mutante causa un desarrollo anómalo en la piel 524
Resumen y palabras clave 527
Preguntas 529
Bibliografía 529

14 *Membrana plasmática 531*

Estructura de la membrana plasmática 531
Bicapa lipídica 531
Proteínas de membrana plasmática 534
Dominios de membrana plasmática 541

Transporte de moléculas pequeñas 544
Difusión facilitada y proteínas transportadoras 544
Canales iónicos 546
Transporte activo dirigido por la hidrólisis de ATP 553
Transporte activo dirigido por gradientes iónicos 558

Endocitosis 560
Fagocitosis 560
Endocitosis mediada por clatrina 561
Endocitosis independiente de clatrina 566

MEDICINA MOLECULAR:
Fibrosis quística 557
EXPERIMENTO CLAVE:
Receptor de las LDL 564
Resumen y palabras clave 568
Preguntas 569
Bibliografía 569

15 *Paredes celulares, matriz extracelular e interacciones celulares 571*

Paredes celulares 571
Paredes celulares bacterianas 571
Paredes celulares eucariotas 572

Matriz extracelular e interacciones célula-matriz 577
Proteínas estructurales de la matriz 578
Polisacáridos de matriz 581
Proteínas de adhesión 582
Interacciones célula-matriz 583

Interacciones célula-célula 587
Uniones adhesivas 588
Uniones estrechas 590
Uniones de tipo *gap* 591
Plasmodesmas 594

EXPERIMENTO CLAVE:
Caracterización de la integrina 584
MEDICINA MOLECULAR:
Enfermedades por las uniones de tipo gap *593*
Resumen y palabras clave 596
Preguntas 597
Bibliografía 597

16 Señalización celular 601

Moléculas señalizadoras y sus receptores 601
Tipos de señalización célula-célula 602
Hormonas esteroideas y superfamilia de receptores de esteroides 603
Óxido nítrico y monóxido de carbono 605
Neurotransmisores 606
Hormonas peptídicas y factores de crecimiento 607
Eicosanoides 608
Hormonas vegetales 610

Señalización de proteínas G y AMP cíclio 611
Proteínas G y receptores asociados a proteínas G 612
Vía del AMPc: segundos mensajeros y fosforilación de proteínas 615
GMP cíclico 618

Tirosina quinasas y señalización por las vías de las quinasas MAP, las PI 3-quinasas y la fosfolipasa C/calcio 619
Receptores proteína-tirosina quinasa 620
No receptores tirosina quinasa 622
Vía de las quinasas MAP 626
Vías de PI 3-quinasa/Akt y mTOR 630
Fosfolípidos C y Ca^{2+} 635

Receptores acoplados a factores de transcripción 637
Vía TGF-β/Smad 637
Señalización vía NF-kB 638
Vías Hedgehog Wnt y Notch 638

Redes de señalización 641
Bucles de realimentación y dinámica de señalización 641
Redes y relaciones cruzadas 642

EXPERIMENTO CLAVE:
Receptores acoplados a proteínas G y detección de olores 613
MEDICINA MOLECULAR:
Cáncer, transducción de señales y oncogenes ras *625*
Resumen y palabras clave 644
Preguntas 647
Bibliografía 648

17 Ciclo celular 651

Ciclo celular eucariota 651
Fases del ciclo celular 652
Regulación del ciclo celular por el crecimiento celular y por señales extracelulares 654
Puntos de control del ciclo celular 656

Reguladores de la progresión del ciclo celular 657
Proteínas quinasas y la regulación del ciclo celular 657
Familias de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas 663
Factores de crecimiento y la regulación de las Cdk de G_1 665
Fases S y regulación de replicación de ADN 668
Puntos de control de lesiones en el ADN 668

Acontecimientos de la fase M 670
Etapas de la mitosis 670
Paso a la mitosis 673
Punto de control de ensamblaje del huso y progresión hacia anafase 677
Citocinesis 678

Meiosis y fecundación 679
Proceso de la meiosis 679
Regulación de la meiosis en los oocitos 682
Fecundación 685

EXPERIMENTO CLAVE:
Descubrimiento del MPF 658
EXPERIMENTO CLAVE:
La identificación de la ciclina 662
Resumen y palabras clave 687
Preguntas 689
Bibliografía 689

18 *Muerte y renovación celular 691*

Muerte celular programada 691
Los eventos de la apoptosis 692
Caspasas: Los ejecutores de la apoptosis 695
Reguladores centrales de la apoptosis: la familia Bcl-2 696
Vías de señalización que regulan la apoptosis 699
Vías alternativas de muerte celular programada 702

Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos 702
Proliferación de células diferenciadas 703
Células madre 705
Aplicaciones médicas de las células madre de adulto 710

Células madre pluripotenciales, reprogramación celular y medicina regenerativa 713
Células madre embrionarias 713
Transferencia nuclear de células somáticas 715
Células madre totipotenciales inducidas 716
Transdiferenciación de células somáticas 718

EXPERIMENTO CLAVE:
Identificación de los genes necesarios para la muerte celular programada 694
EXPERIMENTO CLAVE:
Cultivo de células madre embrionarias 712
Resumen y palabras clave 718
Preguntas 720
Bibliografía 720

19 *Cáncer 723*

Desarrollo y causas del cáncer 723
Tipos de cáncer 723
Desarrollo del cáncer 725
Causas del cáncer 727
Propiedades de las células cancerosas 728
Transformación de las células en cultivo 732

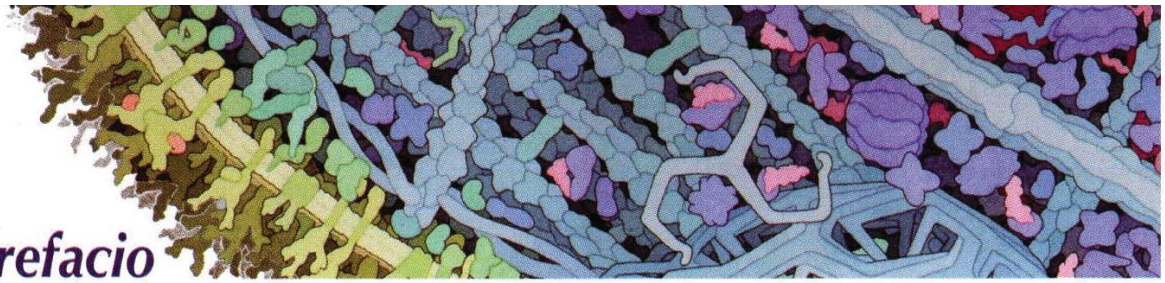
Virus tumorales 733
Virus de la hepatitis B y C 734
Virus tumorales de ADN pequeño 734
Herpesvirus 736
Retrovirus 736

Oncogenes 737
Oncogenes retrovíricos 737
Proto-oncogenes 739
Los oncogenes en el cáncer humano 741
Funciones de los productos oncogénicos 745

Genes supresores de tumores 749
Identificación de los genes supresores de tumores 750
Funciones de los productos de los genes supresores de tumores 753
Cáncer genómico 757
Enfoques moleculares para el tratamiento del cáncer 759
Prevención y detección precoz 759
Tratamiento 760

EXPERIMENTO CLAVE:
Descubrimiento de los proto-oncogenes 740
MEDICINA MOLECULAR:
Imatinib: Tratamiento del cáncer dirigido contra el oncogén bcr/abl *763*
Resumen y palabras clave 765
Preguntas 767
Bibliografía 768

Respuestas a las preguntas 771
Glosario 781



Prefacio

El aprendizaje de la biología celular puede resultar una tarea abrumadora por tratarse de un campo amplio y de rápida evolución, que se caracteriza por una constante explosión de información nueva. El reto consiste en dominar los conceptos básicos sin atascarse en los detalles. Los estudiantes necesitan comprender los principios de la biología celular y los nuevos avances, en lugar de limitarse a memorizar los «datos». Además, el material debe presentarse con el suficiente detalle como para despertar el interés del lector y ofrecer una base sólida para la realización de estudios posteriores. *La Célula* nos presenta los conceptos y los detalles de forma equilibrada, con la intención de satisfacer las necesidades de los estudiantes y las de sus profesores.

La séptima edición de *La Célula* mantiene el principal objetivo de ayudar a los estudiantes a comprender los principios y conceptos de la biología celular contemporánea, al mismo tiempo que descubren la pasión y relevancia de la investigación en este campo de constante evolución. Nuestros conocimientos sobre la célula y la biología molecular han progresado de diferentes maneras en los últimos tres años, y estas mejoras se han incluido en la actual edición. Algunos de los avances más llamativos han continuado surgiendo gracias a los progresos en los ámbitos de la genómica y la proteómica. En esta edición se incluye un nuevo capítulo: *Genómica, proteómica y biología de sistemas*, que se centra en esas áreas de tan rápido desarrollo e incluye un análisis del creciente campo de la biología sintética. Otros avances destacados que se tratan en esta edición incluyen la microscopia de la superresolución, la edición genómica mediante el sistema CRISPR / Cas, la epigenética, la organización de los dominios cromosómicos en el núcleo y un análisis actualizado de los priones y la enfermedad de Alzheimer.

Estos y otros avances se han incorporado a la séptima edición de *La Célula*, no solo para presentar la información más actualizada, sino también la emoción y los retos que nos ofrece la investigación en nuestro campo. Al mismo tiempo, he querido reducir los detalles y centrarme en los conceptos para asegurarme que *La Célula* continúa siendo un libro accesible y claro para estudiantes en su primer curso de biología celular y molecular. Entre los rasgos distintivos de este libro, se encuentran las secciones de Medicina Molecular y Experimentos Clave, que destacan aplicaciones clínicas y describen trabajos de investigación, respectivamente. Junto con los experimentos considerados en el texto, estos ensayos muestran a los estudiantes los avances que se producen en nuestro campo y una idea de cómo se formulan las hipótesis y cómo se interpretan los resultados. De la misma manera que en ediciones anteriores, cada capítulo contiene varias notas al margen para resaltar áreas de interés o de relevancia médica, además de una lista de preguntas al final de cada capítulo con sus respectivas respuestas en las últimas páginas del libro. Para continuar dirigiendo *La Célula* hacia el análisis experimental, muchas de estas cuestiones llevan al alumno a pensar en enfoques experimentales o interpretar resultados, además de ofrecer una revisión del material. Una nueva característica de esta edición es la incorporación a los Recursos Docentes de Problemas de Análisis de Datos. Esos problemas ofrecen datos e imágenes extraídos de informes de investigaciones reales e implican al estudiante en el análisis de métodos experimentales y resultados. Además, incluyen materiales que fomentan la discusión y el aprendizaje activo.

El objetivo primordial ha sido transmitir la ilusión y lo apasionante de la investigación de la célula y la biología molecular contemporánea. Las oportunidades en nuestro campo nunca han sido mayores y espero que *La Célula* estimule a los estudiantes a participar en investigaciones que aparecerán en futuros textos.

Agradecimientos

Estoy especialmente agradecido a Alexandra Adams por la cuidadosa revisión que ha realizado del texto de la séptima edición de *La Célula*. El libro también se ha beneficiado de los comentarios y sugerencias de los críticos, compañeros y profesores que leyeron la edición anterior. Mi más sincero agradecimiento por sus comentarios y sugerencias a:

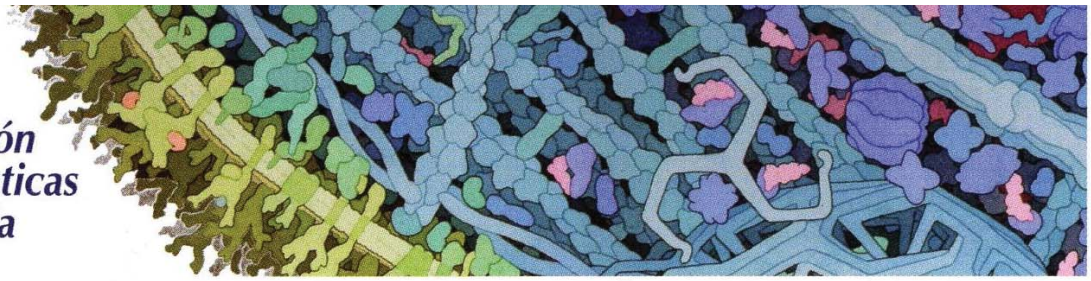
Sage Arbor*, *Marian University*
Rebecca Balish, *Miami University*
Esther Biswas-Fiss, *Thomas Jefferson University*
Edward Bonder, *Rutgers University*
Lucinda Carnell, *Central Washington University*
Xiao-Wen Cheng, *Miami University*
Heather Cook*, *Wagner College*
Gary Coombs*, *Waldorf College*
Paul Davis, *University of Nebraska at Omaha*
Jennifer Freytag*, *The Sage Colleges*
Michael Garcia, *University of Missouri*
David Gardner, *Marian University College of Osteopathic Medicine*
Brittany Gasper, *Florida Southern College*
Mark Grimes, *University of Montana*
Karen Guzman, *Campbell University*
Neil Haave*, *University of Alberta*
Joyce Hardy*, *Chadron State College*
Amber Heck, *Rocky Vista University College of Osteopathic Medicine*
Jose Hernandez, *Midwestern University*
Peter Hoffman, *Notre Dame of Maryland University*
Lisa Kadlec*, *Wilkes University*
Ondra Kielbasa, *Alvernia University*
Janet Kirkley, *Knox College*
Jon Lowrance, *Lipscomb University*
Kaushiki Menon, *Mt. San Antonio College*
Vida Mingo*, *Columbia College*
Craig Moyer, *Western Washington University*
Perpetua Muganda, *North Carolina A&T State University*
Laura Rhoads*, *State University of New York at Potsdam,*
Robert Roberson, *Arizona State University*
German Rosas-Acosta, *The University of Texas at El Paso*
D. Scott Samuels, *University of Montana*
Ken Savage, *The University of British Columbia*
Alexander Schreiber, *St. Lawrence University*
Deborah Schulman, *Lake Erie College*
José Serrano-Moreno, *Western Washington University*
Vishal Shah, *Dowling College*
Mohammad Rafique Uddin, *LeMoyne–Owen College*
Shannon Vandaveer, *University of Kansas*
Thomas Wolkow, *University of Colorado, Colorado Springs*
Kathleen Wood*, *University of Mary Hardin-Baylor*
Robin Young, *The University of British Columbia*

*Revisión de capítulo(s) y Problemas de Análisis de Datos

También es un verdadero placer dar las gracias a nuestro editor por su apoyo constante. Chelsea Holabird ha realizado una magnífica labor editorial. A Jen Basil-Whitaker por su excelente diseño. A Andy Sinauer, Dean Scudder y Christopher Small con los cuales ha sido todo un honor volver a trabajar.

Geoffrey M. Cooper y Robert E. Hausman

Organización y características de La Célula



La Célula es un texto accesible y sencillo que puede ser tratado en un único semestre, además de permitir a los alumnos dominar la materia a lo largo de todo el libro. Muchos de ellos deberán hacer cursos de introducción a la biología y química general, pero no de química orgánica, bioquímica o biología molecular. La organización y características del libro ayudarán a los estudiantes a acercarse y entender su contenido.

Organización

La Célula se divide en cuatro partes, cada una de las cuales es independiente, por lo que se puede cambiar fácilmente de tema o enfatizar aquello que se considere oportuno, en función de las necesidades de cada curso.

La **primera** parte incluye unos capítulos previos sobre la evolución de las células, métodos para estudiarlas, la química de las mismas, los fundamentos de la biología molecular moderna y los campos de la genómica y la biología de sistemas. Para aquellos alumnos que tengan una base muy sólida por haber estudiado un curso de introducción a la biología u otro curso previo en biología molecular, estos capítulos pueden utilizarse para repasar.

La **segunda** parte se centra en la biología molecular de las células, tratando capítulos sobre la organización y secuencias del genoma, replicación, reparación y recombinación del ADN, transcripción y tratamiento del ARN, y la síntesis, tratamiento y regulación de proteínas. El orden sigue el curso de la información genética (ADN→ARN→proteína), y ofrece una visión general de estos temas concisa, pero actualizada.

La **tercera** parte contiene el bloque central de capítulos sobre estructura y función celular, incluyendo otros sobre el núcleo, los orgánulos citoplasmáticos, el citoesqueleto, la membrana plasmática y la matriz extracelular. Esta parte del libro comienza dando cobertura al núcleo, que introduce la biología molecular tratada en la segunda parte en el contexto de la célula eucariótica, para después continuar hacia el exterior a través de los orgánulos citoplasmáticos y el citoesqueleto, hasta la membrana de plasma y el exterior de la célula. Sin embargo, estos capítulos son relativamente independientes, siendo posible variar el orden según las necesidades de cada curso.

Por último, la **cuarta** parte se centra en la emocionante y acelerada zona de la regulación celular, tratando temas como la señalización celular, el ciclo celular, la muerte celular programada y las células madre. Esta parte termina con un capítulo sobre el cáncer, que sintetiza las consecuencias de los mecanismos reguladores de las células básicas.

Características

Varias características pedagógicas se han incorporado a *La Célula* para ayudar a los estudiantes a dominar su contenido. Explicamos estas a continuación a modo de guía para el alumno.

Organización de capítulos. Cada capítulo se divide en de tres a cinco secciones principales, que son, a su vez, subdivididas en un número parecido de subsecciones. El resumen que enumera las secciones principales al principio de cada capítulo ofrece una breve visión de sus contenidos.

Términos clave y glosario. Los términos clave aparecen en negrita y color rojo cada vez que se introducen en cada capítulo. Éstos se repiten en el resumen del mismo y su definición aparece en el glosario al final del libro.

Ilustraciones y micrografías. Un programa de ilustraciones con dibujos a todo color y micrografías se ha desarrollado cuidadosamente como complemento y refuerzo visual del texto.

Ensayos experimentales clave y en medicina molecular. Cada capítulo cuenta con dos ensayos experimentales clave o un experimento clave y un ensayo en medicina molecular. Estas características se han diseñado para dotar al alumno tanto de conocimientos sobre la base experimental de la célula, como de biología molecular y sus aplicaciones a la medicina moderna. Consideramos estos ensayos como una base útil para las secciones de discusión del alumno, que se pueden acompañar con el estudio del artículo original en el que se basen los experimentos clave.

Notas. En cada capítulo pueden encontrarse varias notas que resaltan brevemente los puntos de interés relacionados con el material tratado en el texto. Son un complemento al texto, y fomentan la discusión en clase.

Resumen de los capítulos. Se organizan en forma de esquema, donde aparecen las principales secciones y subsecciones de cada capítulo. Este formato «sección por sección» se complementa con la lista de términos clave introducidos en cada una de ellas, convirtiéndose en un repaso conciso, pero exhaustivo.

Preguntas y respuestas. Conjunto de preguntas al término de cada capítulo (con sus respuestas al final del libro) para facilitar la revisión del material presentado en el capítulo, y alentar a los alumnos a usarlo para predecir o interpretar los resultados experimentales.

Referencias bibliográficas. La amplia lista de referencias bibliográficas que aparece al final de los capítulos permite acceder tanto a estudios como a artículos seleccionados de entre las fuentes primarias. Los estudios y artículos primarios se distinguen por [R] y [P] respectivamente. Resaltados en negrita aparecen los estudios que son especialmente relevantes para cada sección.

Referencias y animaciones. Los estudiantes pueden acceder a las animaciones y los vídeos mediante los enlaces directos a páginas web que aparecen en los cuadros al margen, en los que también se incluye información. En los resúmenes de los capítulos también hay referencias a las animaciones y los vídeos.

sites.sinauer.com/cooper7e/

ANIMACIÓN 1.1

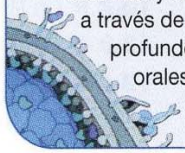
sites.sinauer.com/cooper7e/a1.1

Fraccionamiento celular. Una vez rotas las células por sonicación, sus constituyentes subcelulares son fraccionados mediante diferentes tipos de centrifugación.

VÍDEO 1.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v1.1

Alimentación de los paramecios. *Paramecium caudatum* se nutre de bacterias y otras células pequeñas a través de un surco oral profundo que contiene cilios orales compuestos para extraer el alimento.



A lo largo de todo el libro, encontrará en los márgenes estos pequeños cuadros que se refieren a diversas animaciones y vídeos, que guardan relación al tema que se está tratando

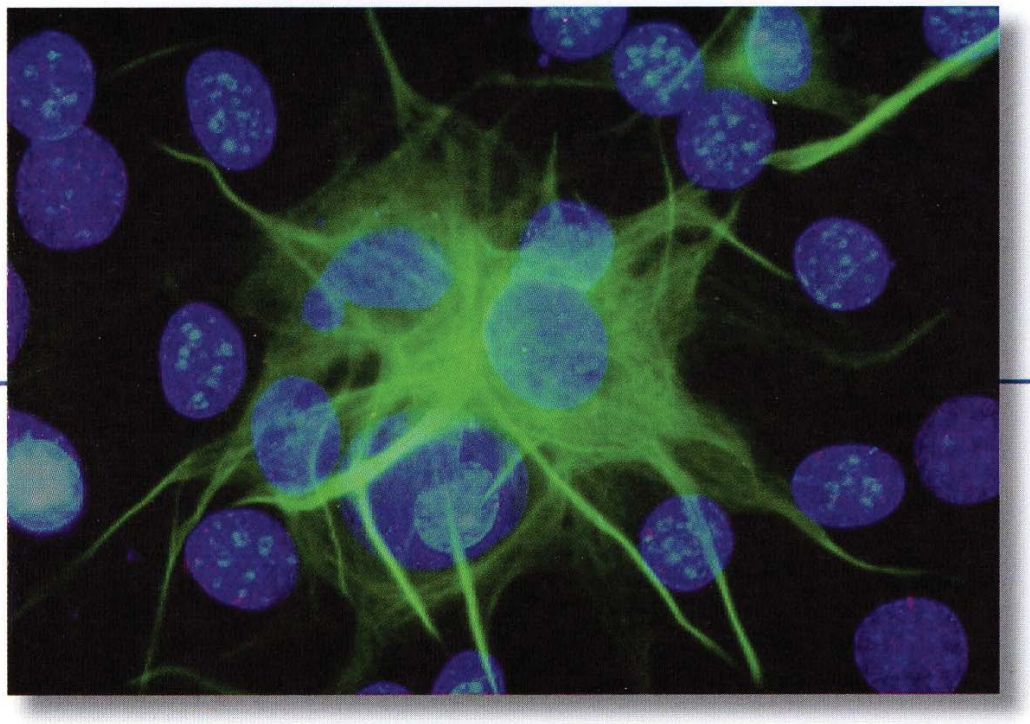
VÍDEO		PÁG.
1.1	Alimentación de los paramecios	14
1.2	Microscopia óptica de superresolución	32
2.1	¿Qué es una proteína?	57
2.2	Efecto de ordenación del colesterol en la bicapa de lípidos	71
3.1	La ATP sintasa en acción	95
4.1	Interferencia de ARN	152
5.1	Una breve introducción a *C. elegans*	159
6.1	Cómo se empaqueta el ADN	205
7.1	Mecanismo de replicación de ADN	217
7.2	Reparación no complementaria dirigida por metilo	240
8.1	Transcripción de ADN	261
8.2	Mecanismos epigenéticos	284
9.1	Traducción del ARNm	326
9.2	Simulación del plegamiento de proteínas	338
9.3	Mecanismos de la enfermedad de Alzheimer	341
10.1	Complejo del poro nuclear	375
10.2	En el núcleo	376
11.1	Transporte a través de la vía secretora	399
11.2	Gemación desde el aparato de Golgi	427
11.3	Transporte post-Golgi	428
11.4	Tráfico vesicular	431
12.1	Redes mitocondriales	448
12.2	Dinámica mitocondrial	448
12.3	Cloroplastos en *Elodea*	459
13.1	Lamelipodios	490
13.2	Movimiento celular	491
13.3	Movimiento inducido por filamentos de actina	492
13.4	Movimiento de las vesículas a lo largo de microtúbulos	512
13.5	Movimiento mitocondrial	513
13.6	Movimientos ciliados	514
13.7	Flagelos en *Euglena*	514
13.8	Movimiento coordinado de los cilios	515
14.1	Fluidez de la membrana	535
14.2	Recambio de la balsa lipídica	542

VÍDEO		PÁG.
14.3	Endocitosis mediada por clatrina	561
15.1	Adhesiones focales	586
15.2	Adhesiones dinámicas focales	586
15.3	Cadherinas	589
16.1	Receptores tirosina quinasas	620
17.1	Mitosis en tiempo real	651
17.2	División de la levadura de fisión	654
17.3	Mitosis	671
17.4	Mitosis con proteínas fluorescentes	672
17.5	Punto de control de ensamblaje del huso	677
17.6	Metafase y anafase	678
18.1	Apoptosis	691
18.2	Apoptosis inducida por la activación Fas	702
18.3	Células del latido cardíaco diferenciadas	714
18.4	Control de las células madre con luz	715
18.5	Transferencia nuclear de células somáticas	715
19.1	Células normales y cancerosas.	723
19.2	Células de cáncer de mama en división	725

ANIMACIÓN		PÁG.
1.1	Separación subcelular	34
2.1	Formación de enlaces	48
2.2	Catalizadores y activación de la energía	62
2.3	Reacciones catalizadas por enzimas	64
3.1	Glicólisis	85
3.2	El ciclo del ácido cítrico	87
3.3	Reacciones lumínicas	96
3.4	El ciclo de Calvin	100
4.1	Transformación bacteriana	116
4.2	Avery, MacLeod y McCarty	116
4.3	El «Dogma Central»	121
4.4	Mutaciones del ADN	123
4.5	Reproducción del VIH	124
4.6	Endonucleasas de restricción	126
4.7	Moléculas de ADN recombinante	128
4.8	Secuenciación de una hebra de ADN	132
4.9	Reacción en cadena de la polimerasa	135
4.10	Hibridación de ácidos nucleicos	137
4.11	Southern blot	137
4.12	Hibridación de colonias	139
4.13	Anticuerpos monoclonales	140
5.1	Secuenciación de la siguiente generación	164
5.1	Tecnología de micromatrices de ADN	167
6.1	Cromatina y cromosomas	204
7.1	Horquilla de replicación del ADN	225
7.2	Genes de las cadenas ligeras	250
7.3	Genes de las cadenas pesadas	250
8.1	Transcripción	260
8.2	Procesamiento del ARN	297
9.1	Traducción	326
9.2	Ruta de la ubiquitina-proteasoma	358
10.1	Importación y exportación nuclear	375
11.1	Dirección contraduccional de proteínas de secreción al RE	400
11.2	La organizacion del Golgi	422
12.1	De proplástido a cloroplasto	465
13.1	Ensamblaje de un filamento de actina	480
13.2	Un filamento fino	496
13.3	Ensamblaje de microtúbulos	503
13.4	Quinesina	508
14.1	Una sinapsis química	549
14.2	Bomba de NA^+ -K^+	553
14.3	Endocitosis	561
14.4	Inv. y vesículas cubiertas de clatrina	563
15.1	Síntesis de celulosa durante la elongación	576
16.1	Señalización mediante mol. secretadas	603
16.2	Transducción de la señal	612
16.3	Amplificación de la señal	617
17.1	Fases del ciclo celular	652
17.2	Ciclos de las células embrionarias	653
17.3	Puntos de control de ciclo celular	656
17.4	Ciclinas, Cdk y el ciclo celular	663
17.5	Mitosis en una célula animal	670
17.6	Citocinas en las plantas superiores	678
17.7	Meiosis	680
17.8	Comparación de meiosis I y mitosis	681
17.9	Profase I de la meiosis	681
17.10	Formación de cuerpos polares	683
18.1	Apoptosis	693
18.2	Vía mitocondrial de la apoptosis	699
19.1	Metástasis de un cáncer	724
19.2	Inhibición dependiente de la densidad	729

Parte I

Principios básicos



Capítulo 1 Visión global de la célula e investigación celular

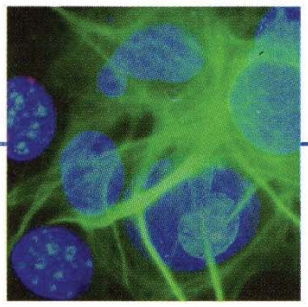
Capítulo 2 Moléculas y membranas

Capítulo 3 Bioenergía y metabolismo

Capítulo 4 Fundamentos de biología molecular

Capítulo 5 Genómica, proteómica y biología de sistemas

Principios básicos



Capítulo 1

Visión global de la célula e investigación celular

Origen y evolución de las células 4

Células como modelos experimentales 17

Instrumentos de la biología celular 22

EXPERIMENTO CLAVE:
Células HeLa 37

MEDICINA MOLECULAR:
Virus y cáncer 41

La biología molecular de las células es una de las áreas de investigación activa más importantes de las ciencias biológicas. Esto es cierto no sólo desde el punto de partida de la ciencia básica, sino también respecto a numerosas aplicaciones de la biología molecular y celular en medicina, ingeniería biomédica, biotecnología y agricultura. Especialmente por su habilidad para obtener secuencias rápidas del genoma completo del individuo, el progreso de la biología celular y molecular está abriendo nuevos horizontes en la práctica médica. Ejemplos llamativos incluyen la identificación de genes que influyen en la susceptibilidad individual a diversas enfermedades comunes, como las cardiopatías, la artritis reumatoide y la diabetes; el desarrollo de nuevos fármacos especialmente diseñados para interferir con el crecimiento de células cancerosas; y el uso potencial de células madre para sustituir tejidos dañados y tratar pacientes que padecen enfermedades como la diabetes, enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y lesiones de la médula espinal.

Dado que la biología celular y molecular es un campo de investigación de tan rápido crecimiento, es importante comprender sus bases experimentales y el estado actual de nuestro conocimiento. Este capítulo se centrará en cómo se estudian las células, y servirá para revisar sus propiedades básicas. La apreciación de las similitudes y diferencias entre las células resulta particularmente importante para entender la biología celular. La primera sección de este capítulo, por tanto, discutirá la unidad y la diversidad de las células presentes hoy en día en términos de su evolución desde un ancestro común. Por otra parte, todas las células comparten propiedades fundamentales que se han conservado a través de la evolución. Por ejemplo, todas las células utilizan ADN como material genético, están rodeadas por una membrana plasmática y usan los mismos mecanismos básicos para el metabolismo energético. Por otro lado, las células actuales han evolucionado en diferentes estilos de vida. Muchos organismos, como las bacterias, amebas y levaduras, se componen de células únicas capaces de autorreplicarse independientemente. Los organismos más complejos están compuestos por una colección de células que funcionan de manera coordinada, con diferentes células especializadas para desarrollar funciones particulares. El cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto de más de 200 tipos diferentes de células, cada una de ellas especializada para una función distintiva, como la memoria, la vista, el movimiento o la digestión. La diversidad exhibida por los diferentes tipos de células es sorprendente; por ejemplo, consideremos las diferencias entre las bacterias y las células del cerebro humano.

Las similitudes fundamentales entre los diferentes tipos de células proporcionan un marco común para la biología celular, permitiendo que los

principios básicos aprendidos a partir de experimentos con un solo tipo de célula puedan ser extrapolados y generalizados a otros tipos de células. Diversos tipos de células y organismos son extensamente utilizados para estudiar los diferentes aspectos de la biología celular y molecular; la segunda sección de este capítulo expone algunas de las propiedades de estas células que las hacen particularmente valiosas como modelos experimentales. Finalmente, es importante reconocer que el progreso de la biología celular depende también de los instrumentos experimentales que permiten a los científicos hacer nuevas observaciones o desarrollar experimentos novedosos. Este capítulo de presentación concluye, por tanto, con una exposición sobre algunos experimentos utilizados para el estudio de las células, a la vez que resume algunos de los descubrimientos históricos que han llevado a nuestro conocimiento actual sobre la estructura de la célula y su función.

Origen y evolución de las células

Las células se dividen en dos clases principales, inicialmente definidas según contengan o no núcleo. Las **células procariotas** carecen de envoltura nuclear; las **células eucariotas** presentan un núcleo donde el material genético está separado del citoplasma. Las células procariotas son generalmente más pequeñas y simples que las células eucariotas; además de la ausencia de núcleo, sus genomas son menos complejos y no contienen orgánulos citoplasmáticos (**Tabla 1.1**). Al margen de estas diferencias, los mismos mecanismos moleculares básicos gobiernan las vidas de procariotas y eucariotas, indicando que todas las células presentes hoy descienden de un ancestro primordial único. ¿Cómo se desarrolló la primera célula? ¿Y cómo evolucionaron la complejidad y la diversidad que exhiben las células actuales?

La primera célula

Parece ser que la vida emergió hace, al menos, 3.800 millones de años, aproximadamente 750 millones de años después de que se formara la Tierra. Cómo se originó la vida y cómo la primera célula se convirtió en un ser son cuestiones sujetas a especulación, puesto que estos acontecimientos no pueden reproducirse en el laboratorio. No obstante, diferentes tipos de experimentos han proporcionado evidencias importantes sobre algunos pasos del proceso.

En 1920 se sugirió por primera vez que moléculas orgánicas simples podrían polimerizar espontáneamente y formar macromoléculas bajo las condiciones que se pensaba que existían en la atmósfera primitiva. En el momento en el que surgió la vida, se cree que la atmósfera de la Tierra contenía poco o ningún oxígeno libre, constando principalmente de CO_2 y N_2 además de pequeñas cantidades de gases como H_2, H_2S y CO. Tal atmósfera proporciona condiciones reductoras en las que las moléculas orgánicas, con una fuente de energía como la luz solar o descargas eléctricas, se pueden formar espontáneamente. La formación espontánea de las moléculas orgá-

TABLA 1.1 Células procariotas y eucariotas

Características	Procariota	Eucariota
Núcleo	Ausente	Presente
Diámetro de una célula típica	≈1 μm	10-100 μm
Orgánulos citoplasmáticos	Ausente	Presente
Contenido de ADN (pares de bases)	1×10^6 a 5×10^6	$1{,}5 \times 10^7$ a 5×10^9
Cromosomas	Una molécula de ADN circular	Múltiples moléculas de ADN lineal

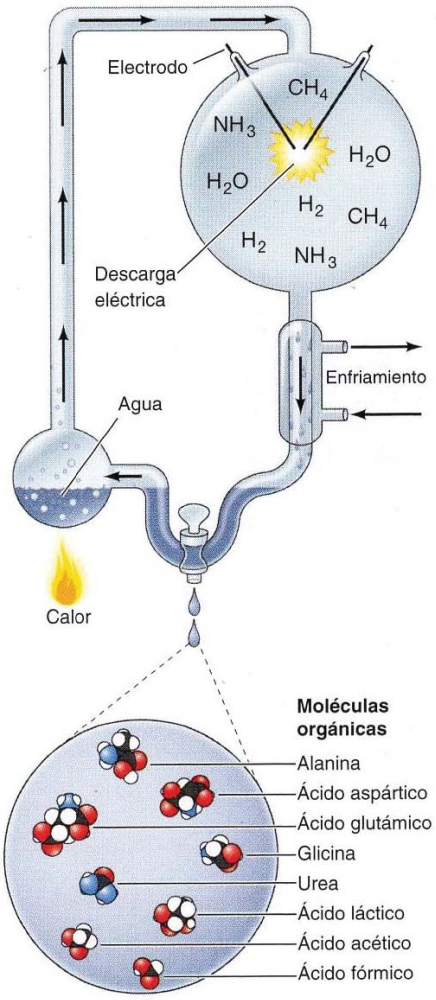


FIGURA 1.1 Formación espontánea de las moléculas orgánicas. El vapor de agua se expulsaba a una atmósfera que consistía en CH_4, NH_3 y H_2, en la que se descargaban chispas de electricidad. El análisis de los productos de la reacción reveló la formación de varias moléculas orgánicas, incluyendo los aminoácidos alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y glicina.

nicas fue demostrada por primera vez experimentalmente en los años 50, cuando Stanley Miller (un estudiante en aquel entonces) demostró que la descarga de chispas eléctricas en una mezcla de H_2, CH_4 y NH_3, en presencia de agua, conducía a la formación de una variedad de moléculas orgánicas, incluyendo varios aminoácidos (**Fig. 1.1**). Aunque el experimento de Miller no reprodujo con precisión las condiciones primitivas de la Tierra, claramente demostró la plausibilidad de la síntesis espontánea de las moléculas orgánicas, proporcionando los materiales básicos desde donde surgieron los primeros organismos vivos.

El siguiente paso en la evolución fue la formación de las macromoléculas. Se ha demostrado que los bloques monoméricos que constituyen las macromoléculas se polimerizan espontáneamente bajo condiciones prebióticas plausibles. El calentamiento de mezclas secas de aminoácidos, por ejemplo, da como resultado su polimerización para formar polipéptidos. Pero la característica fundamental de la macromolécula de la que surgió la vida debe tener la habilidad de replicarse por sí misma. Solamente una macromolécula capaz de dirigir la síntesis de nuevas copias de sí misma sería capaz de reproducirse y evolucionar.

De las dos clases principales de macromoléculas que aportan información en las células actuales (ácidos nucleicos y proteínas), sólo los ácidos nucleicos son capaces de dirigir su propia replicación. Los ácidos nucleicos pueden servir como molde para su propia síntesis como resultado del apareamiento de bases específicas entre nucleótidos complementarios (**Fig. 1.2**). Uno de los pasos críticos en el aprendizaje de la evolución molecular ocurrió a principios de los años 80, cuando se descubrió en los laboratorios de Sid Altman y Tom Cech que el ARN es capaz de catalizar numerosas reacciones químicas, incluyendo la polimerización de nucleótidos. Estudios anteriores han ampliado los conocimientos de las actividades catalíticas de ARN, incluyendo la descripción de las moléculas de ARN que dirigen la síntesis de una nueva hebra de ARN desde un molde de ARN. El ARN es, por tanto, el único capaz de servir como molde y catalizar su propia replicación. Como consecuencia, se cree que el ARN ha sido el sistema genético inicial, y que una etapa temprana de la evolución química estuvo basada en

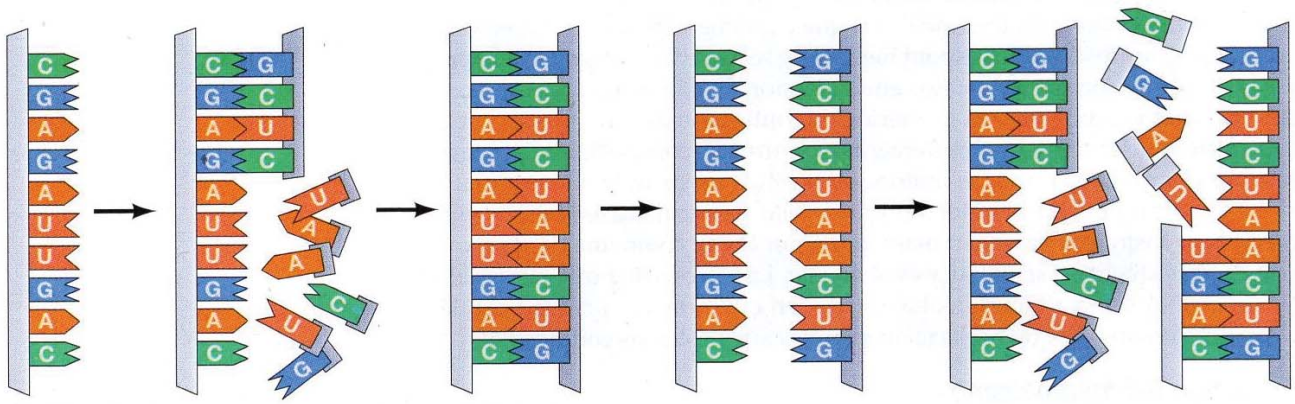


FIGURA 1.2 Autorreplicación propia del ARN. Las parejas complementarias entre los nucleótidos (adenina [A] con uracilo [U] y guanina [G] con citosina [C]) permiten que una hebra de ARN sirva como molde para la síntesis de una nueva hebra con la secuencia complementaria.

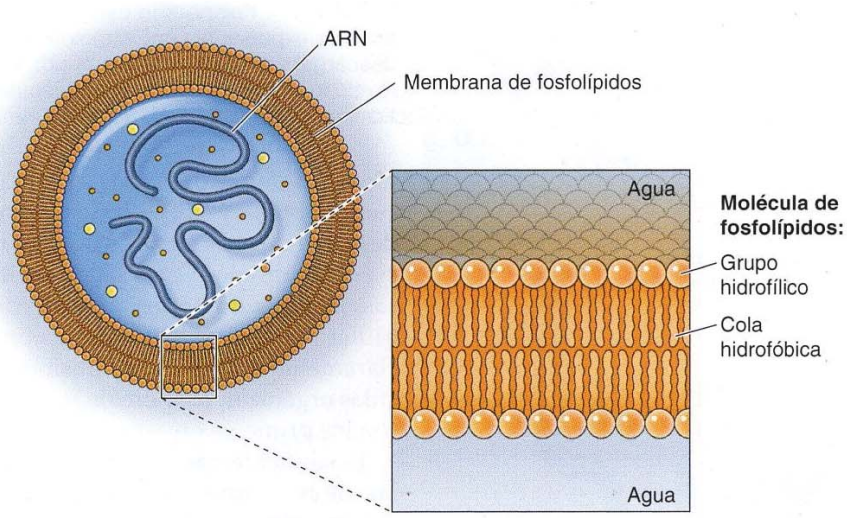


FIGURA 1.3 Recubrimiento del ARN de autorreplicación con una membrana de fosfolípidos. Se cree que la primera célula surgió del recubrimiento del ARN autorreplicante y sus moléculas asociadas por una membrana compuesta de fosfolípidos. Cada molécula de fosfolípidos presenta dos largas colas hidrofóbicas unidas a un grupo hidrofílico. Las colas hidrofóbicas están embebidas en la bicapa lipídica; las cabezas hidrofílicas están expuestas al agua a ambos lados de la membrana.

moléculas de ARN con replicación propia —un período de la evolución conocido como el **mundo del ARN**—. Las interacciones en orden entre el ARN y los aminoácidos evolucionaron a lo que hoy es el código genético, y eventualmente el ADN reemplazó al ARN como el material genético.

Tal y como se describe en detalle en el capítulo 4, todas las células actuales utilizan ADN como material genético, y emplean los mismos mecanismos básicos para la replicación del ADN y la expresión de la información genética. Los **genes** son las unidades funcionales de la herencia, y corresponden a segmentos de ADN que codifican proteínas o moléculas de ARN. La secuencia de nucleótidos de un gen se copia a ARN mediante un proceso denominado **transcripción.** En el caso de los ARN que codifican proteínas, su secuencia de nucleótidos se emplea después para determinar el orden de los aminoácidos de una proteína en el proceso de **traducción.**

Se presupone que la primera célula surgió de la envoltura del ARN de replicación propia en una membrana compuesta por **fosfolípidos** (**Fig. 1.3**). Tal y como se expondrá en detalle en el próximo capítulo, los fosfolípidos son los componentes básicos de todas las membranas biológicas presentes hoy día, incluyendo la membrana plasmática de células procariotas y eucariotas. La característica clave de los fosfolípidos que forman las membranas es que son moléculas **anfipáticas**, lo que quiere decir que una porción de la molécula es soluble en agua y la otra porción no. Los fosfolípidos presentan largas cadenas hidrocarbonadas insolubles en agua (**hidrofóbicas**) unidas a grupos solubles en agua (**hidrofílicos**) que contienen fosfatos. En contacto con el agua, los fosfolípidos espontáneamente se agrupan en una bicapa con los grupos que contienen fosfatos en el exterior, en contacto con el agua, y sus colas hidrocarbonadas en el interior, en contacto unas con otras. Esta bicapa fosfolipídica forma una barrera estable entre dos compartimentos acuosos, por ejemplo, separando el interior de la célula de su ambiente externo.

La envoltura del ARN autorreplicante y las moléculas asociadas a una membrana fosfolipídica se han mantenido, por tanto, como una unidad, capaz de reproducirse a sí misma y evolucionar. La síntesis de proteínas a partir del ARN pudo ya haber evolucionado, en cuyo caso la primera célula consistiría en un ARN de replicación propia y sus proteínas codificadas.

Evolución del metabolismo

Debido a que las células se originaron en un mar de moléculas orgánicas, estas eran capaces de obtener alimento y energía directamente de su ambiente. Pero una situación como esta es limitada en sí misma, por lo que las célu-

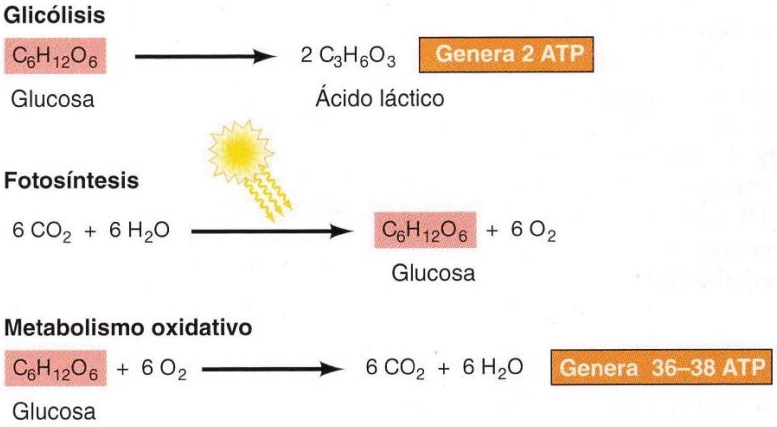


FIGURA 1.4 Generación de energía metabólica. La glicólisis es la rotura anaerobia de la glucosa en ácido láctico. La fotosíntesis utiliza la energía del sol para conducir la síntesis de la glucosa a partir del CO_2 y el H_2O, liberando O_2 como producto. El O_2 liberado por la fotosíntesis lo utiliza el metabolismo oxidativo, en el que la glucosa se rompe en CO_2 y H_2O, liberando mucha más energía que la obtenida de la glicólisis.

las necesitaron evolucionar sus propios mecanismos de creación de energía y sintetizar las moléculas necesarias para su replicación. La creación y la utilización controlada de la energía metabólica es primordial para todas las actividades celulares, y los procesos principales de metabolismo energético (analizados en detalle en el Cap. 3) se han conservado prácticamente intactos en las células actuales. Todas las células utilizan **adenosina 5′-trifosfato** (ATP) como fuente de energía metabólica para llevar a cabo la síntesis de los constituyentes celulares y conducir otras actividades que requieren energía, como el movimiento (p. ej., la contracción muscular). Los mecanismos utilizados por las células para generar ATP han evolucionado en tres etapas, correspondientes a la evolución de la glicólisis, fotosíntesis y metabolismo oxidativo (**Fig. 1.4**). El desarrollo de estos procesos metabólicos cambió la atmósfera de la Tierra, alterando en consecuencia el curso de la evolución.

En la atmósfera anaerobia inicial de la Tierra, las primeras reacciones generadoras de energía presumiblemente implicaron la escisión de moléculas orgánicas en ausencia de oxígeno. Estas reacciones parecen ser una forma de la actual **glicólisis** —la rotura anaerobia de la glucosa a ácido láctico, con la ganancia neta de energía de dos moléculas de ATP—. Además de utilizar ATP como su fuente de energía química intracelular, todas las células actuales llevan a cabo la glicólisis, de acuerdo con la idea de que estas reacciones surgieron muy pronto en la evolución.

La glicólisis proporcionó un mecanismo mediante el cual la energía en moléculas orgánicas ya formadas (p. ej., la glucosa) podía convertirse en ATP, que podía ser utilizado como fuente de energía para dirigir otras reacciones metabólicas. El desarrollo de la **fotosíntesis** fue el siguiente paso más importante de la evolución, que permitió a la célula generar energía a partir de la luz solar y ser independientes de la utilización de las moléculas orgánicas ya existentes. La primera bacteria fotosintética probablemente utilizaba H_2S para convertir CO_2 en moléculas orgánicas —todavía algunas bacterias utilizan un proceso de fotosíntesis similar—. La utilización de H_2O como donante de electrones e hidrógeno para la conversión del CO_2 a compuestos orgánicos evolucionó más tarde y tuvo la importante consecuencia de cambiar la atmósfera de la Tierra. El uso de H_2O en reacciones fotosintéticas produce O_2 libre; se cree que este mecanismo ha sido el responsable de hacer a la atmósfera de la Tierra tan abundante en O_2, fenómeno que tuvo lugar hace unos 2.400 millones de años.

La liberación de O_2 como consecuencia de la fotosíntesis cambió el medio en el que las células evolucionaron, y se cree que determinó el desarrollo del **metabolismo oxidativo**. Alternativamente, el metabolismo oxidativo podría haber evolucionado antes que la fotosíntesis, y el aumento del O_2 at-

mosférico proporcionaría una importante ventaja selectiva a los organismos capaces de utilizar O_2 en las reacciones de generación de energía. En cualquier caso, el O_2 es una molécula altamente reactiva, y el metabolismo oxidativo, usando esta reactividad, ha proporcionado un mecanismo de generación de energía a partir de moléculas orgánicas mucho más eficientes que la glicólisis anaerobia. Por ejemplo, la rotura oxidativa completa de la glucosa en CO_2 y H_2O produce energía equivalente a 36 ó 38 moléculas de ATP, en comparación con las dos moléculas de ATP que se forman en la glicólisis anaerobia (véase Fig. 1.4). Con pocas excepciones, las células actuales utilizan reacciones oxidativas como fuente principal de energía.

◆ La existencia de organismos en condiciones extremas ha dado lugar a la hipótesis de que la vida podía existir en ambientes similares en otros lugares del sistema solar. El campo de la astrobiología (o exobiología) busca encontrar señales de esta vida extraterrestre.

Procariotas actuales

Los procariotas actuales están divididos en dos grupos —las **arquebacterias** y las **bacterias**— que se diferenciaron al principio de la evolución. Algunas arquebacterias viven en condiciones extremas, que hoy en día son inusuales pero que pudieron prevalecer en la primitiva Tierra. Por ejemplo, los termoacidófilos viven en pozos calientes de sulfuro con temperaturas hasta de 80 °C y valores de pH de 2. Las bacterias incluyen las formas comunes de procariotas que están presentes en nuestros días —un amplio grupo de organismos que viven en una gran variedad de ambientes, como la tierra, el agua y otros organismos (p. ej., los patógenos humanos).

La mayoría de las células procariotas son esféricas, en forma de bastón, o espiral, con diámetros que oscilan de 1 a 10 μm. Su contenido de ADN varía

TABLA 1.2 Genomas celulares

Organismo	Contenido de ADN haploide (millones de pares de bases)	Número de genes
Arqueobacterias		
Methanococcus jannaschii	1,7	1.700
Bacterias		
Mycoplasma	0,6	470
E. coli	4,6	4.200
Cyanobacterium	3,6	3.200
Eucariotas unicelulares		
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	12	6.000
Dictyostelium discoideum	34	12.000
Paramecium	72	39.500
Chlamydomonas	118	14.500
Volvox	138	14.500
Plantas		
Arabidopsis thaliana	125	26.000
Maíz	2.200	33.000
Manzana	740	57.000
Animales		
Caenorhabditis elegans (nematodo)	97	19.000
Drosophila melanogaster (mosca de la fruta)	180	14.000
Pollo	1.200	20-23.000
Pez cebra	1.700	26.000
Xenopus tropicalis	1.700	20-21.000
Ratón	3.000	20-22.000
Humano	3.000	21.000

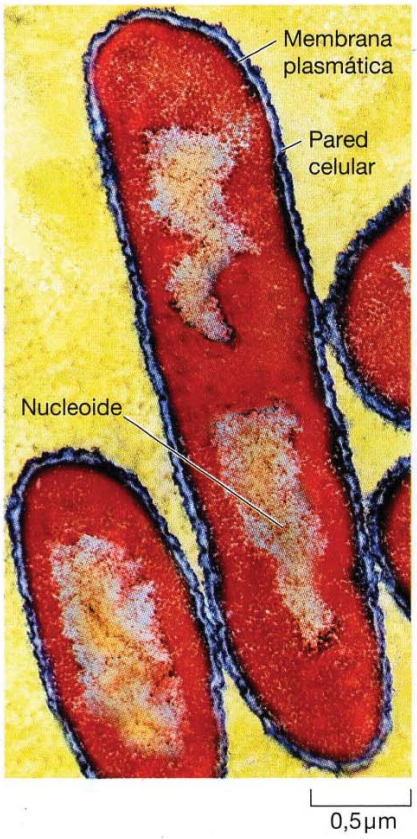


FIGURA 1.5 Micrografía electrónica de *E. coli*. La célula está rodeada por una pared celular; debajo de esta se encuentra la membrana plasmática. El ADN se localiza en el nucleoide. La fotografía ha sido coloreada artificialmente.

desde unos 0,6 millones a 5 millones de pares de bases, cantidad suficiente para codificar unas 5.000 proteínas diferentes. Los procariotas más grandes y complejos son las **cianobacterias**, bacterias en las que evolucionó la fotosíntesis (**Tabla 1.2**).

La estructura de célula procariota típica es la de ***Escherichia coli* (*E. coli*)**, un habitante común del tracto intestinal humano (**Fig. 1.5**). La célula tiene forma de bastón, alrededor de 1 µm de diámetro y cerca de 2 µm de longitud. Como la mayoría de los otros procariotas, *E. coli* está rodeada por una **pared celular** rígida compuesta de polisacáridos y péptidos. Dentro de la pared celular se encuentra la **membrana plasmática**, que es una bicapa de fosfolípidos y proteínas asociadas. Mientras que la pared celular es porosa y puede ser penetrada por una variedad de moléculas, la membrana plasmática proporciona una separación funcional entre el interior de la célula y su medio externo. El ADN de *E. coli* es una molécula circular única en el nucleoide, que, en comparación con el núcleo de los eucariotas, no está rodeado por una membrana que lo separe del citoplasma. El citoplasma contiene aproximadamente 30.000 **ribosomas** (lugar de la síntesis de proteínas), que destacan por su apariencia granular.

Células eucariotas

Como las células procariotas, todas las células eucariotas están rodeadas por membranas plasmáticas y contienen ribosomas. No obstante, las células eucariotas son mucho más complejas y contienen un núcleo y variedad de orgánulos citoplasmáticos (**Fig. 1.6**). El orgánulo más grande y prominente de las células eucariotas es el **núcleo**, con un diámetro aproximado de 5 µm. El núcleo contiene la información genética de la célula, que en los eucariotas se encuentra organizada de forma lineal en lugar de moléculas de ADN circular. El núcleo es el sitio de la replicación del ADN y de la síntesis del ARN; la traducción del ARN en proteínas tiene lugar en los ribosomas del citoplasma.

Además de un núcleo, las células eucariotas contienen una variedad de orgánulos delimitados por membranas dentro del citoplasma. Estos orgánulos proporcionan diferentes compartimentos en los que se localizan las distintas actividades metabólicas. Las células eucarióticas son por lo general más grandes que las células procariotas, con frecuencia presentando un volumen celular cien veces mayor. La compartimentalización proporcionada por los orgánulos citoplasmáticos es lo que permite a las células eucariotas funcionar con eficiencia. Dos de estos orgánulos, las **mitocondrias** y los **cloroplastos**, juegan papeles imprescindibles en el metabolismo energético. Las mitocondrias, que se encuentran en casi todas las células eucariotas, son los centros del metabolismo oxidativo y son por tanto las responsables de generar la mayoría del ATP derivado de la rotura de moléculas orgánicas. Los cloroplastos son los centros donde se lleva a cabo la fotosíntesis y se encuentran exclusivamente en las células de las plantas y algas verdes. Los **lisosomas** y los **peroxisomas** también proporcionan compartimentos metabólicos especializados para la digestión de macromoléculas y varias reacciones oxidativas, respectivamente. Además, la mayoría de las células de las plantas contienen grandes **vacuolas** que desarrollan variedad de funciones, incluyendo la digestión de macromoléculas y el almacenaje de productos de desecho y nutrientes.

Debido al tamaño y complejidad de las células eucariotas, el transporte de proteínas a sus destinos dentro de la célula es una labor formidable. Dos orgánulos citoplasmáticos, el **retículo endoplasmático** y el **aparato de Golgi**, están específicamente dedicados a la diferenciación y transporte de las proteínas destinadas a la secreción, a la incorporación en la membrana plasmática y a la incorporación en los lisosomas. El retículo endoplasmático es

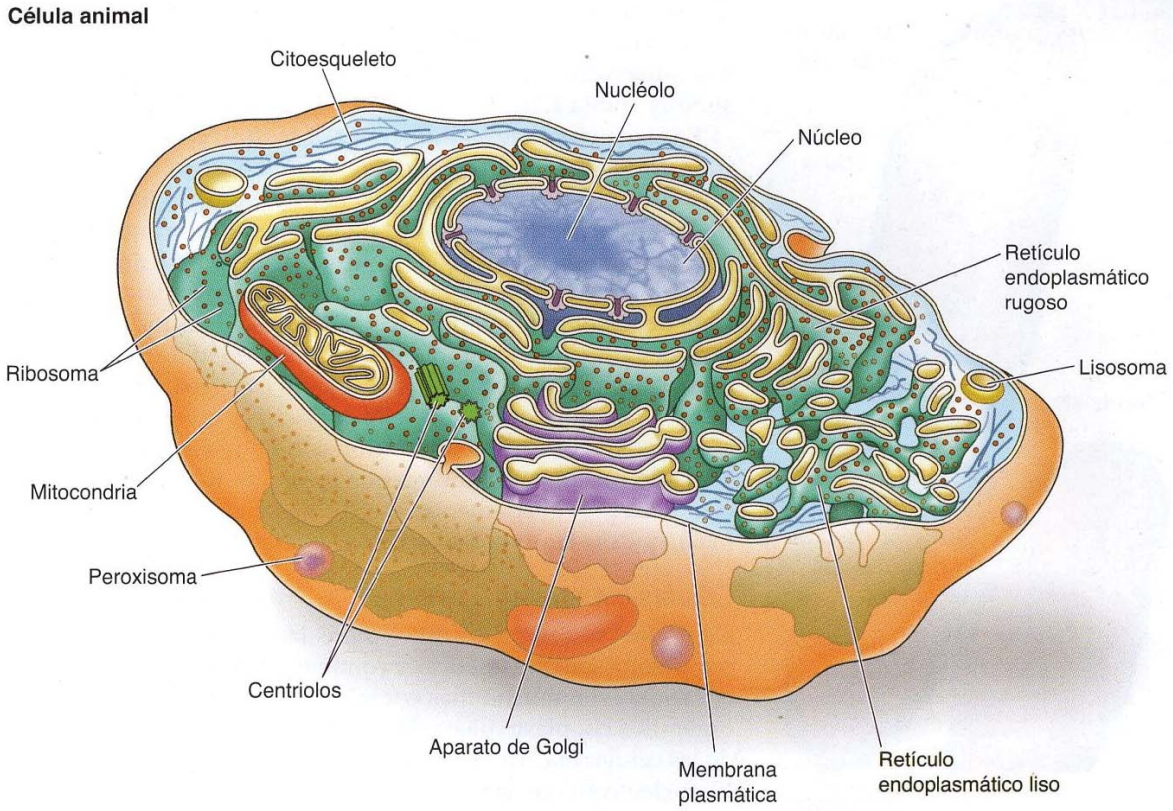


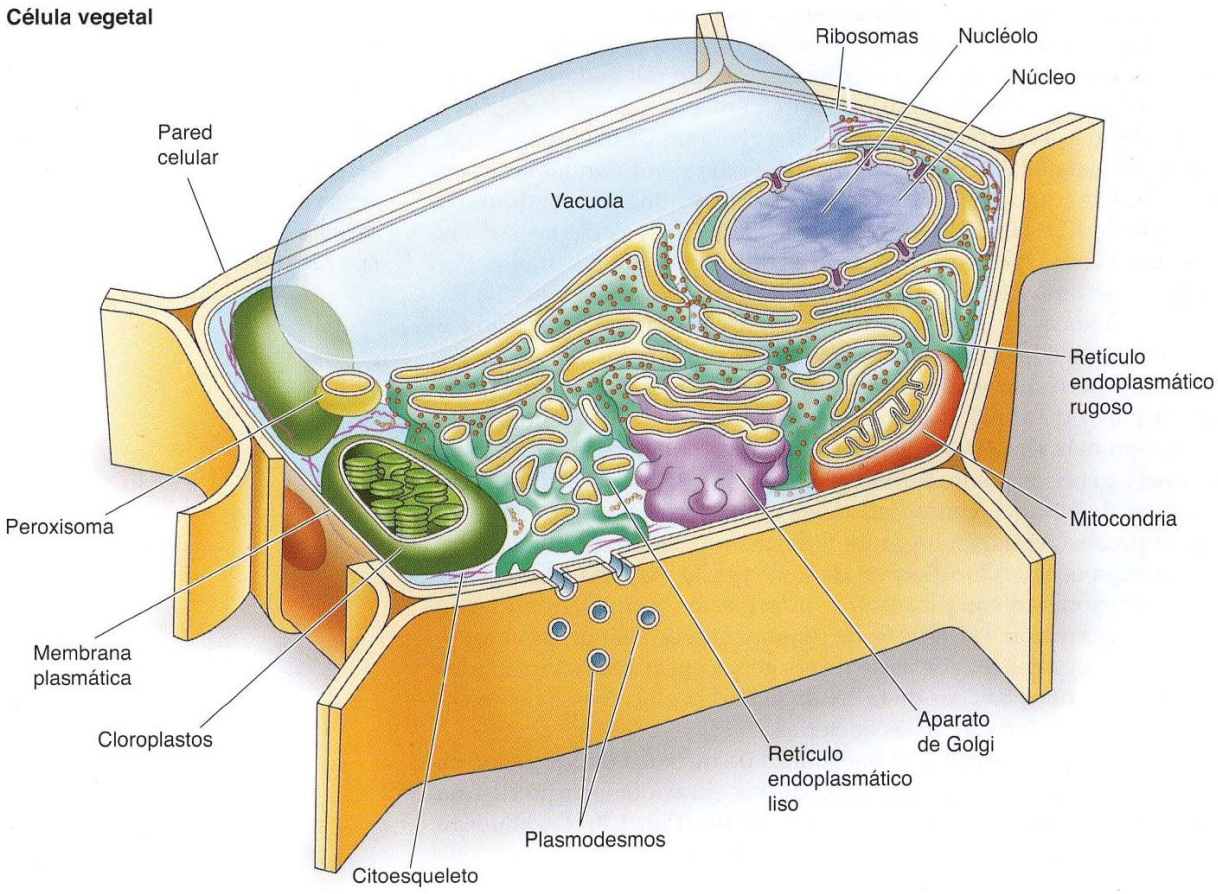
FIGURA 1.6 Estructuras de las células animales y vegetales. Las células animales y vegetales están rodeadas por una membrana plasmática y contienen un núcleo, un citoesqueleto y muchos orgánulos citoplasmáticos en común. Las células vegetales también están rodeadas por una pared celular y contienen cloroplastos y vacuolas grandes.

una red extensa de membranas intracelulares, que se extienden desde la membrana nuclear hasta atravesar todo el citoplasma. No solo actúa en el proceso y transporte de proteínas, sino también en la síntesis de lípidos. Desde el retículo endoplasmático, las proteínas son transportadas dentro de pequeñas vesículas al aparato de Golgi, donde siguen siendo procesadas y clasificadas para el transporte a sus destinos finales. Además de esta función de transporte de proteínas, el aparato de Golgi presenta síntesis de lípidos y (en células de las plantas) síntesis de algunos polisacáridos que componen la pared celular.

La organización interna de las células eucariotas está mantenida por el **citoesqueleto,** una red de filamentos proteínicos que se extienden por el citoplasma. El citoesqueleto proporciona el marco estructural de la célula, determinando la forma celular y la organización general del citoplasma. Además, el citoesqueleto es responsable de los movimientos de todas las células (p. ej., la contracción de las células musculares), del transporte intracelular y la posición de los orgánulos y otras estructuras, incluyendo los movimientos de los cromosomas durante la división celular.

El origen de los eucariotas

Un paso crítico en la evolución de las células eucariotas fue la adquisición de orgánulos subcelulares encerrados por membranas, permitiendo el desarrollo de la complejidad característica de estas células. Los orgánulos de los eucariotas se cree que han surgido por **endosimbiosis** —una célula viviendo en el interior de otra—. En concreto, los orgánulos eucarióticos se



cree que han evolucionado a partir de células procariotas que vivían en el interior de los ancestros de los eucariotas.

La hipótesis de que las células eucariotas evolucionaron por endosimbiosis está especialmente bien apoyada con los estudios de las mitocondrias y los cloroplastos, los cuales se cree que han evolucionado desde bacterias que vivían en células grandes. Las mitocondrias y los cloroplastos tienen un tamaño similar al de las bacterias, y como ellas, se reproducen mediante su escisión bipartita. Lo más importante es que las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio ADN, que codifica algunos de sus componentes. El ADN de las mitocondrias y cloroplastos se replica cada vez que el orgánulo se divide, y los genes que contiene se transcriben dentro del orgánulo y se traducen en los ribosomas de este. Por lo tanto, las mitocondrias y los cloroplastos contienen sus propios sistemas genéticos, que son diferentes del genoma nuclear de la célula. Además, los ribosomas y los ARN ribosómicos de estos orgánulos están más relacionados con los bacterianos que aquellos codificados por los genomas nucleares de los eucariotas.

En general, se ha aceptado un origen endosimbiótico de estos orgánulos, suponiendo que la mitocondria ha evolucionado a partir de las bacterias aerobias y los cloroplastos de las bacterias fotosintéticas, como las cianobacterias. La adquisición de bacterias aerobias podría provenir de una célula anaerobia con la habilidad de llevar a cabo un metabolismo oxidativo. La adquisición de bacterias fotosintéticas podría provenir de la habilidad para desarrollar la fotosíntesis, permitiendo su independencia nutricional. Por tanto, estas asociaciones endosimbióticas resultaron muy beneficiosas para

sus asociados, que fueron seleccionados en el curso de la evolución. A través del tiempo, la mayoría de los genes originalmente presentes en estas bacterias en apariencia pasaron a incorporarse dentro del genoma nuclear de la célula, así que solamente algunos componentes de las mitocondrias y cloroplastos siguen siendo codificados por los genomas de los orgánulos.

El origen preciso de las células eucarióticas sigue siendo un tema sin esclarecer en nuestra comprensión de la evolución temprana. Los estudios de sus secuencias de ADN indican que las arqueobacterias y bacterias son tan distintas entre sí como cada una de ellas lo es de los eucariotas actuales. Por lo tanto, un suceso muy temprano en la evolución parece haber sido la divergencia de dos líneas de descendentes a partir de un ancestro procariótico común, dando lugar a las arqueobacterias y bacterias actuales. Sin embargo, ha sido difícil determinar si algunos eucariotas evolucionaron a partir de bacterias o a partir de arqueobacterias. Sorprendentemente, algunos genes eucarióticos son más similares a genes bacterianos mientras que otros son más similares a genes arqueobacterianos. El genoma de los eucariotas parece así consistir de algunos genes derivados de bacterias y de otros procedentes de arqueobacterias, en lugar de reflejar un genoma de un ancestro bacteriano o arqueobacteriano. Sorprendentemente, la mayoría de los genes eucarióticos relacionados con procesos de información (como la replicación del ADN, la transcripción y la síntesis de proteínas) proceden de las arqueobacterias, mientras que la mayor parte de los genes eucarióticos vinculados con procesos operativos básicos de la célula (como la glucólisis y la biosíntesis de aminoácidos) derivan de las bacterias.

Una hipótesis reciente explica la naturaleza de mosaico de los genomas eucarióticos proponiendo que el genoma de los eucariotas surgió de una fusión de genomas arqueobacteriano y bacteriano (**Fig. 1.7**). De acuerdo

◆ Algunos protistas marinos actuales engloban algas para que sirvan como endosimbiontes que llevan a cabo la fotosíntesis para sus hospedadores.

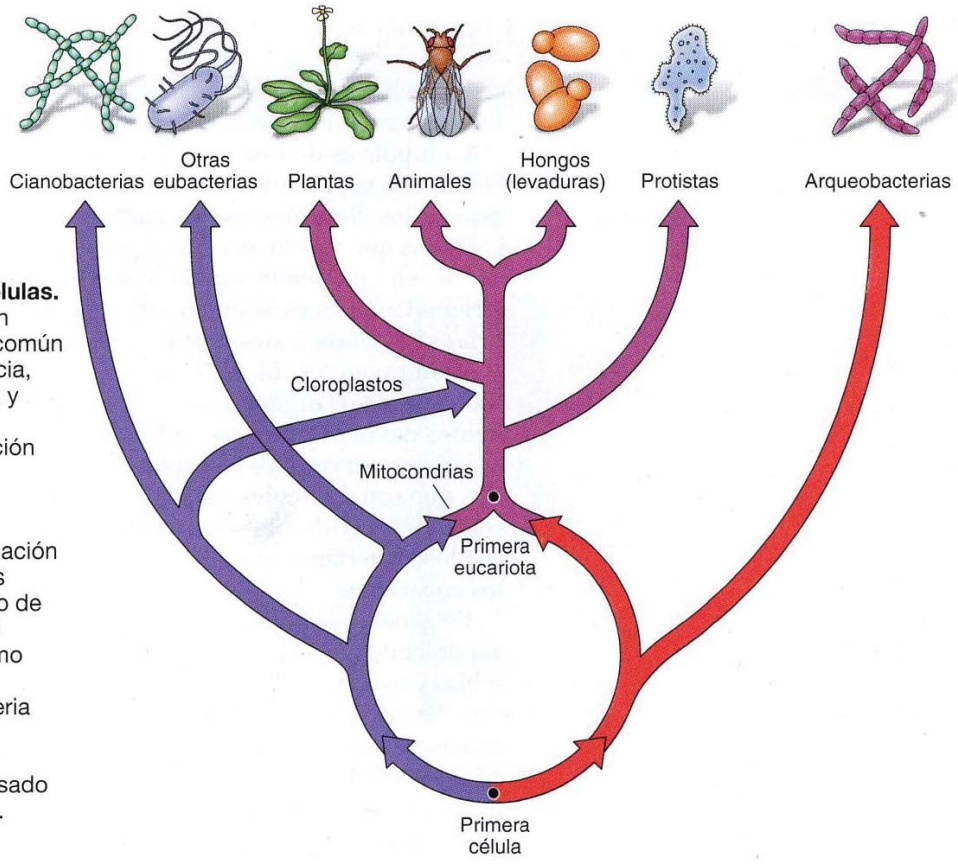


FIGURA 1.7 Evolución de las células. Las células actuales evolucionaron desde un antepasado procariota común a tres largas líneas de descendencia, dando lugar a las arqueobacterias y bacterias. Las células eucariotas pueden haber surgido por asociación endosimbiótica de una bacteria aeróbica con una arqueobacteria, dando lugar al desarrollo de mitocondrias además de a la formación del genoma eucariótico con genes derivados tanto de bacterias como de arqueobacterias. Los cloroplastos evolucionaron posteriormente como resultado de la asociación endosimbiótica de una cianobacteria con el antecesor de las plantas. El modelo para la formación de la primera célula eucariótica está basado en M. C. Rivera y J. A. Lake, 2004. *Nature* 431: 152.

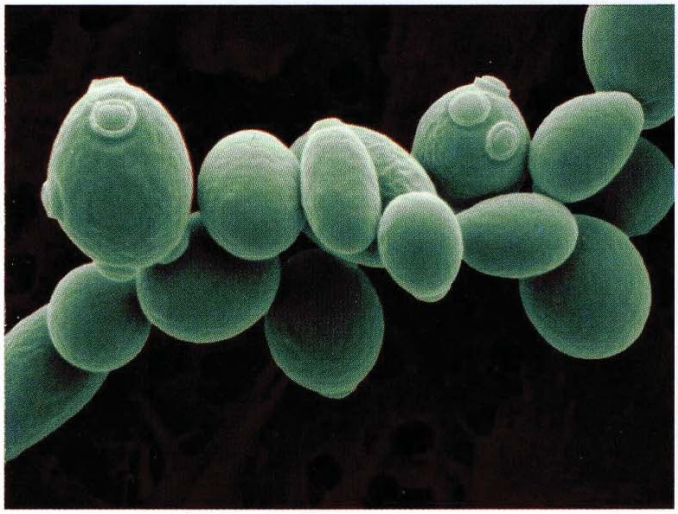


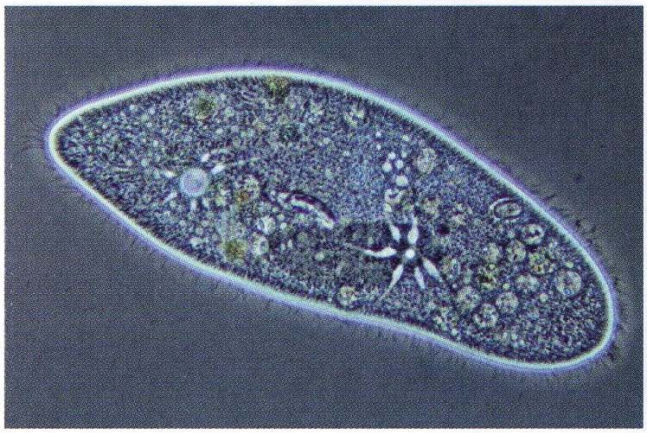
FIGURA 1.8 Micrografía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae*. Micrografía con color artificial. Las levaduras son los eucariotas más simples. (© Medical-on-Line/Alamy.).

con esta proposición, una asociación endosimbiótica entre una bacteria y una arqueobacteria fue seguida de una fusión de dos genomas procarióticos, dando lugar a un genoma eucariótico ancestral con contribuciones tanto de bacterias como de arqueobacterias. La versión más sencilla de esta hipótesis es que una relación endosimbiótica inicial de una bacteria que vivía en el interior de una arqueobacteria, dio lugar no sólo a las mitocondrias sino también al genoma de las células eucarióticas, conteniendo genes derivados de ambos ancestros procarióticos.

Desarrollo de organismos multicelulares

Muchos eucariotas son organismos unicelulares que, como las bacterias, se componen de células únicas capaces de su propia replicación. Los eucariotas más simples son las **levaduras** (véase Tabla 1.2). Las levaduras son más complejas que las bacterias, pero mucho más pequeñas y simples que las células animales o vegetales. Por ejemplo, la levadura hasta ahora más estudiada ***Saccharomyces cerevisiae*** tiene un diámetro aproximado de 6 µm y contiene 12 millones de pares de bases de ADN (**Fig. 1.8**). Sin embargo, otros eucariotas unicelulares son células mucho más complejas, con genomas sustancialmente más grandes y complejos. Estos incluyen organismos especializados para desarrollar gran variedad de funciones, incluyendo la fotosíntesis, el movimiento y la captura e ingestión de otros organismos como alimento. El protozoo ciliado *Paramecium*, por ejemplo, es una célula grande y compleja que puede alcanzar hasta 350 µm de longitud, y está especializado en el movimiento y la ingestión de bacterias y levaduras (**Fig. 1.9**). Curiosamente, el genoma del *Paramecium* contiene casi el doble de genes que el humano (véase Tabla 1.2), hecho representativo de que ni el tamaño del genoma ni el número de genes están directamente relacionados con la complejidad de un organismo, resultado inesperado de la

(A)



(B)

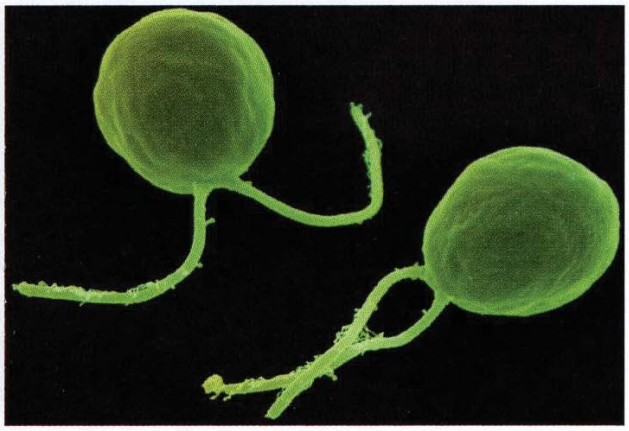


FIGURA 1.9 Micrografía óptica de *Paramecium* y micrografía electrónica de barrido de *Chlamydomonas*. (A) *Paramecium* y (B) *Chlamydomonas* son ejemplos de eucariotas unicelulares más complejos que las levaduras.

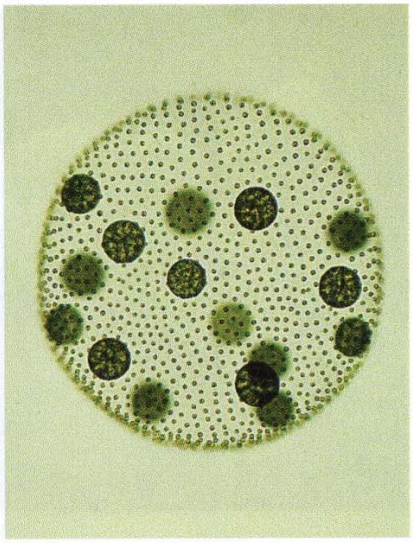


FIGURA 1.10 Alga verde multicelular. El alga *Volvox* está compuesta por unas 16 células germinales y 2.000 células somáticas inmersas en una matriz gelatinosa. (Por cortesía de David Kirk.)

secuencia genómica, discutido en los Capítulos 5 y 6. Otros eucariotas unicelulares, como el alga verde *Chlamydomonas* (véase Fig. 1.9), contienen cloroplastos y son capaces de realizar la fotosíntesis.

Se cree que la evolución de los organismos multicelulares a partir de eucariotas unicelulares tuvo lugar hace 1.000-2.000 millones de años. Las algas, por ejemplo, constan de especies unicelulares y multicelulares. El alga verde multicelular *Volvox* tiene células de dos tipos distintos: unas 16 células germinales de gran tamaño y 2.000 células somáticas parecidas a las del alga unicelular *Chlamydomonas* (**Fig. 1.10**). Las dos especies, *Chlamydomonas* y *Volvox*, tienen genomas de tamaño y complejidad similares, unas 10 veces mayores que el de las levaduras, con 14.000-15.000 genes (véase Tabla 1.2). Otro ejemplo de la transición a la multicelularidad es la ameba *Dictyostelium discoideum*, capaz de alternar entre formas uni- y multicelulares según la disponibilidad de alimento (**Fig. 1.11**).

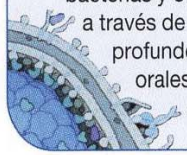
El aumento de la especialización celular y la división del trabajo en las células de los organismos multicelulares simples dio lugar después a la complejidad y diversidad observadas en los múltiples tipos de células que componen las plantas y animales actuales, seres humanos incluidos. Las plantas tienen menos tipos de células que los animales, pero cada clase de célula vegetal está especializada para realizar funciones específicas requeridas por el organismo en su conjunto (**Fig. 1.12**). Las células vegetales se organizan en tres sistemas de tejidos principales: tejido basal, dérmico y vascular. El tejido basal contiene las células del parénquima, que llevan a cabo la mayor parte de las reacciones metabólicas de la planta, incluida la fotosíntesis. El tejido basal también cuenta con dos tipos celulares especializados (células del colénquima y del esclerénquima) que se caracterizan por poseer paredes celulares gruesas y aportar soporte estructural a la planta. El tejido dérmico recubre la superficie de la planta y está compuesto por células epidérmicas, que forman una capa protectora y permiten la absorción de

VÍDEO 1.1

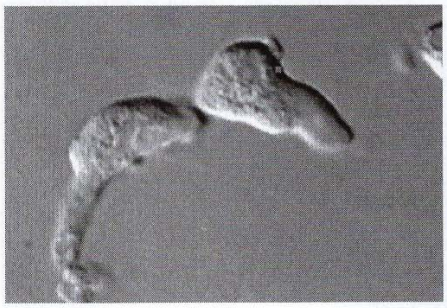
sites.sinauer.com/cooper7e/v1.1

Alimentación de los paramecios.

Paramecium caudatum se nutre de bacterias y otras células pequeñas a través de un surco oral profundo que contiene cilios orales compuestos para extraer el alimento.



(A)



(B)

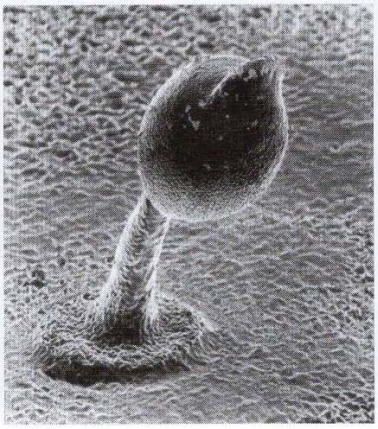


FIGURA 1.11 *Dyctyostelium discoideum*. En ausencia de alimento, las amebas unicelulares (A) se agregan para formar un cuerpo generador multicelular, especializado en la dispersión de esporas (B). (A, cortesía de David Knecht, University of Connecticut.)

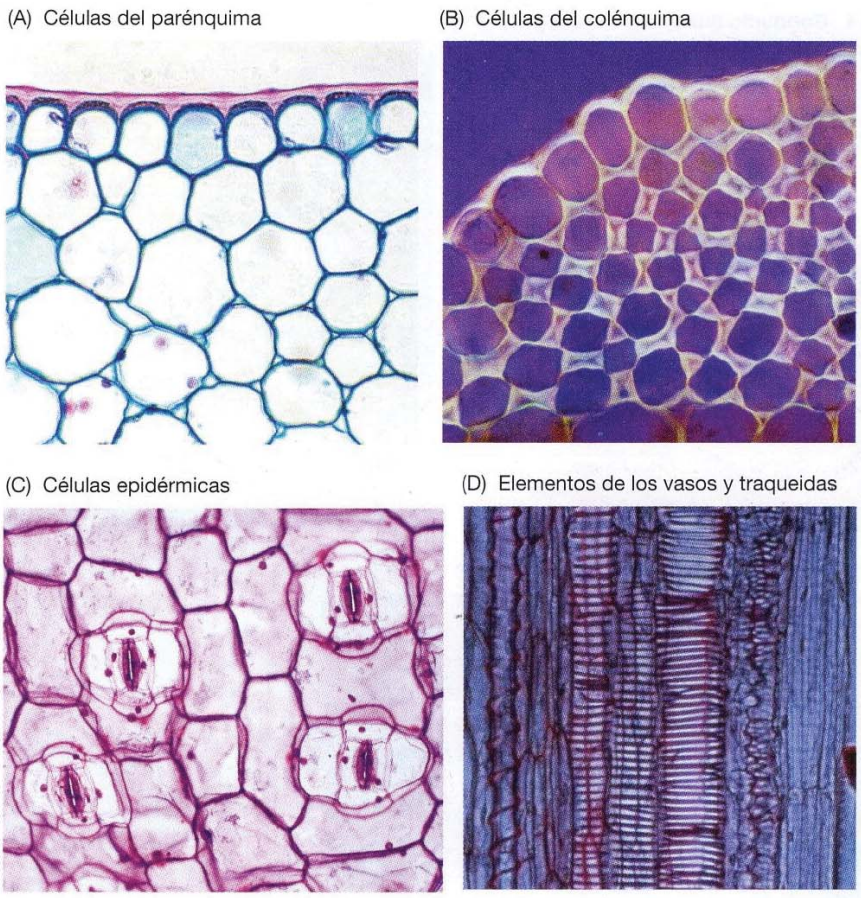


FIGURA 1.12 Micrografías ópticas de células vegetales representativas. (A) Células del parénquima, responsables de la fotosíntesis y de otras reacciones metabólicas. (B) Células del colénquima, especializadas para dar soporte y endurecer las paredes celulares. (C) Células epidérmicas en la superficie de una hoja. Pequeños poros (estomas) se encuentran flanqueados por células especializadas denominadas células guardia. (D) Los elementos de los vasos y las traqueidas son células alargadas que se disponen enfrentadas para formar los vasos del xilema.

nutrientes. Por último, el sistema vascular (xilema y floema) está compuesto por varios tipos de células alargadas, y es el responsable del transporte de agua y nutrientes por toda la planta.

Las células presentes en animales son considerablemente más diversas que las de las plantas. El cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto por más de 200 tipos de células diferentes, consideradas generalmente como componentes de los cinco tipos principales de tejidos: tejido epitelial, tejido conectivo, sangre, tejido nervioso y tejido muscular (**Fig. 1.13**). Las **células epiteliales** forman láminas que cubren la superficie del cuerpo y delimitan los órganos internos. Existen muchos tipos diferentes de células epiteliales, cada una especializada para una función específica, incluyendo protección (la piel), absorción (p. ej., las células del intestino delgado), y secreción (p. ej., células de la glándula salivar). El tejido conectivo incluye hueso, cartílago y tejido adiposo, cada uno de los cuales está formado por diferentes tipos de células (osteoblastos, condrocitos y adipocitos, respectivamente). El tejido conectivo suelto que delimita con las capas epiteliales y rellena los espacios entre los órganos y tejidos del cuerpo está formado por otro tipo de células, los **fibroblastos**. La sangre contiene diferentes tipos de células: los glóbulos rojos (**eritrocitos**) funcionan en el transporte de oxígeno, y los glóbulos blancos (**granulocitos, monocitos, macrófagos** y **linfocitos**) funcionan en las reacciones inflamatorias y en la respuesta inmune. El tejido nervioso está formado por células nerviosas, o **neuronas**, que están altamente especializadas en la trasmisión de señales a través del cuerpo. Varios tipos de células sensoriales, como las células del ojo y el oído, están aún más es-

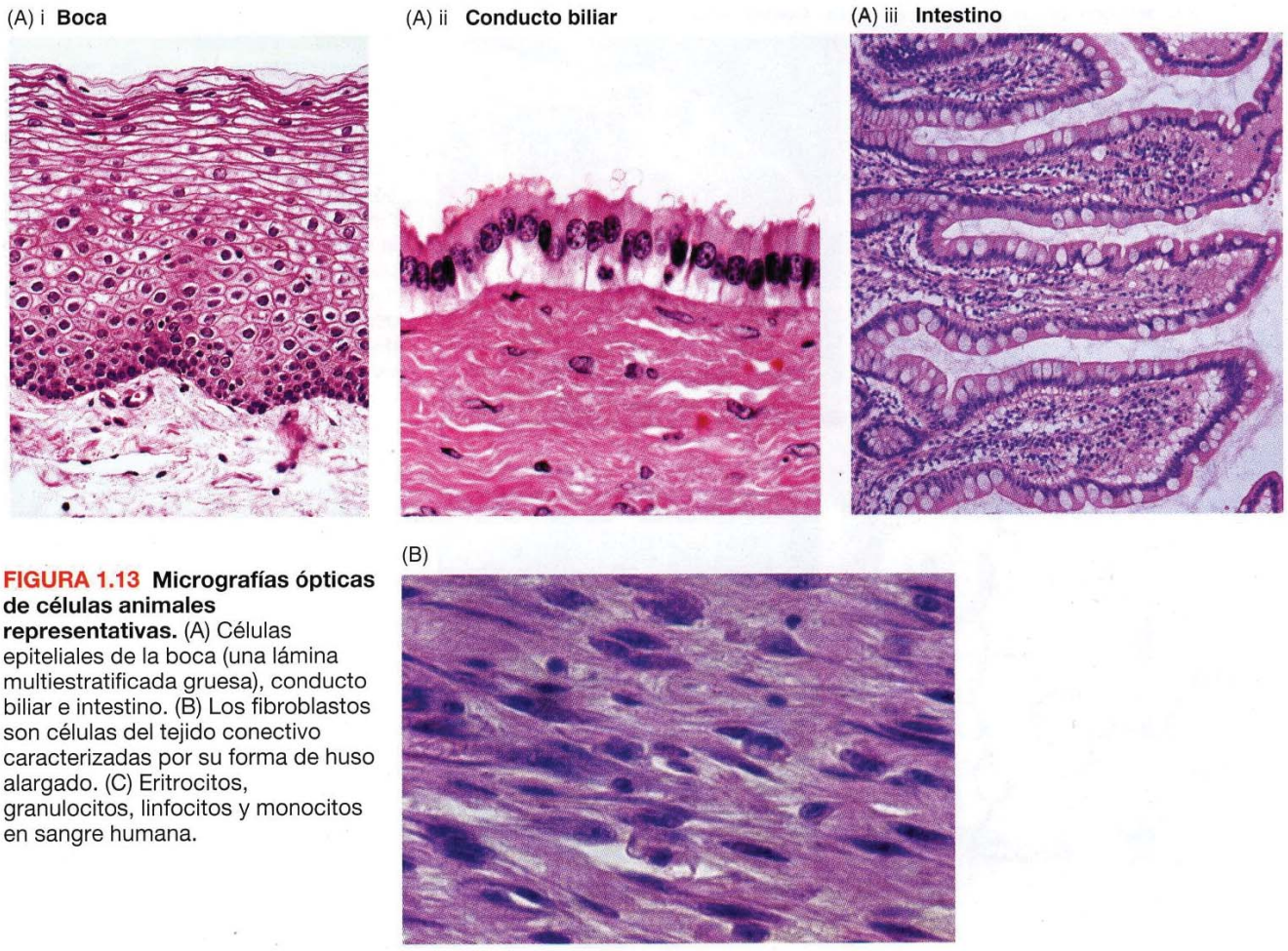


FIGURA 1.13 Micrografías ópticas de células animales representativas. (A) Células epiteliales de la boca (una lámina multiestratificada gruesa), conducto biliar e intestino. (B) Los fibroblastos son células del tejido conectivo caracterizadas por su forma de huso alargado. (C) Eritrocitos, granulocitos, linfocitos y monocitos en sangre humana.

pecializadas en la recepción de señales del ambiente. Finalmente, diferentes tipos de células musculares son responsables de la producción de fuerza y movimiento.

La evolución de los animales claramente implica el desarrollo de una diversidad y especialización considerable a nivel celular. Entender los mecanismos que controlan el crecimiento y diferenciación de estas células tan complejas y especializadas, desde la fertilización de un solo huevo, es uno de los mayores desafíos de la biología celular y molecular contemporánea.

Células como modelos experimentales

La evolución de las células actuales a partir de su antepasado común tiene importantes implicaciones para la biología celular y molecular como ciencia experimental. Debido a que las propiedades fundamentales de todas las células se han conservado durante la evolución, los principios básicos obtenidos de los experimentos desarrollados con un solo tipo de célula son generalmente aplicables a otras células. Por otra parte, debido a la diversidad de las células actuales, muchos de los experimentos son más fáciles de llevar a cabo con un tipo de células en lugar de otras. Se utilizan diferentes tipos de células y organismos como modelos experimentales para estudiar diversos aspectos de la biología celular y molecular. Las características de algunas de estas células que resultan particularmente ventajosas como modelos experimentales se discuten en las siguientes secciones. En muchos casos, la disponibilidad de secuencias genómicas completas incrementa el valor de estos organismos como sistemas modelo para la comprensión de la biología molecular de las células.

E. coli

Debido a la simplicidad de su comparativa, las células procariotas (bacterias) son los modelos ideales para el estudio de los aspectos fundamentales de la biología molecular y la bioquímica. La especie de bacterias mejor estudiada es *Escherichia coli (E. coli)*, que ha sido el organismo por excelencia en la investigación de los mecanismos básicos de la genética molecular. La mayoría de los conceptos actuales de la biología molecular —incluyendo nuestra comprensión sobre la replicación del ADN, el código genético, la expresión génica y la síntesis de proteínas— derivan de los estudios sobre esta humilde bacteria.

E. coli ha resultado especialmente útil para los biólogos moleculares debido a su relativa simplicidad y la facilidad para propagarse y ser estudiada en el laboratorio. El genoma de *E. coli*, por ejemplo, consiste en aproximadamente 4,6 millones de pares de bases y contiene aproximadamente unos 4.000 genes. El genoma humano es casi mil veces mayor (aproximadamente 3 billones de pares de bases) y se cree que contiene alrededor de 21.000 genes codificadores de proteínas (véase Tabla 1.2). El tamaño pequeño del genoma de *E. coli* proporciona claras ventajas para el análisis genético.

Los experimentos genéticos moleculares se ven facilitados por el rápido crecimiento de *E. coli* bajo condiciones de laboratorio predeterminadas. Bajo condiciones óptimas de cultivo, *E. coli* se divide cada 20 minutos. Además, una población clónica de *E. coli*, en la que todas las células se derivan de la división de una única célula original, se puede aislar fácilmente como una colonia en crecimiento en un medio que contenga agar semisólido (**Fig. 1.14**). Debido a que las colonias bacterianas que contienen más de 10^8 células se pueden desarrollar en una noche, la selección de variantes genéticas de una cepa de *E. coli* —por ejemplo, mutantes que son resistentes a un antibiótico, como la penicilina— es fácil y rápida. La facilidad con la que estos mutantes pueden ser seleccionados y analizados resultó clave para el éxito de los experimentos que definen los principios básicos de la genética molecular, discutidos en el Capítulo 4.

Las mezclas nutritivas en las que *E. coli* se divide más rápidamente incluyen glucosa, sales y varios compuestos orgánicos, tales como aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos. No obstante, *E. coli* también puede crecer en un medio mucho más simple que contenga solamente sales, una fuente de nitrógeno (como el amoníaco), y una fuente de carbón y energía (como la glucosa). En este medio, la bacteria crece un poco más lenta (con un tiempo de división de unos 40 minutos) ya que tiene que sintetizar todos sus aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos orgánicos. La habilidad de *E. coli* para llevar a cabo estas reacciones biosintéticas en un medio

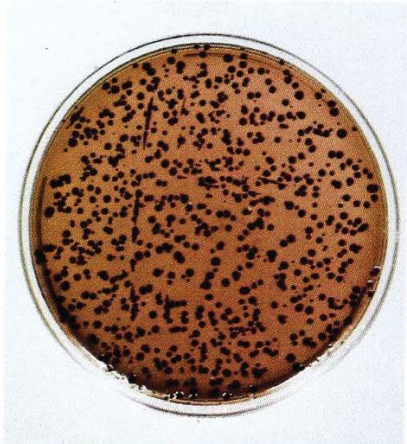


FIGURA 1.14 Colonias de bacterias. Fotografía de colonias de *E. coli* creciendo en la superficie de un medio de agar.

simple ha hecho que sea extremadamente útil para el descubrimiento de los procesos bioquímicos implicados. Por tanto, el rápido crecimiento y los simples requisitos nutricionales de *E. coli* han facilitado los experimentos fundamentales de la biología molecular y la bioquímica.

Levaduras

Aunque las bacterias han sido un modelo de valor incalculable para el estudio de muchas de las propiedades conservadas de las células, éstas obviamente no pueden ser utilizadas para estudiar aspectos de la estructura y función celulares que son únicos de eucariotas. Las levaduras, los eucariotas más simples, aportan numerosas ventajas experimentales similares a las de *E. coli*. En consecuencia, las levaduras han proporcionado un modelo crucial para el estudio de muchos de los aspectos fundamentales de la biología celular eucariota.

El genoma de la levadura que con más frecuencia se ha estudiado, *Saccharomyces cerevisiae*, consiste en 12 millones de pares de bases de ADN y contiene alrededor de 6.000 genes. Aunque el genoma de las levaduras es aproximadamente tres veces mayor que el de *E. coli*, resulta más manejable que los genomas de eucariotas más complejos, como el de los humanos. Incluso en su simplicidad, la célula de levadura exhibe las características típicas de las células eucariotas (**Fig. 1.15**): Contiene un núcleo distinto rodeado por una membrana nuclear, su ADN genómico está organizado en 16 cromosomas lineales, y su citoplasma contiene orgánulos subcelulares.

Las levaduras pueden crecer con facilidad en el laboratorio y pueden ser estudiadas bajo muchos de los mismos protocolos genéticos moleculares que han resultado satisfactorios con *E. coli*. Aunque las levaduras no se replican tan rápidamente como las bacterias, se dividen cada 2 horas y pueden crecer fácilmente dando lugar a colonias a partir de una sola célula. Las levaduras se pueden utilizar en variedad de manipulaciones genéticas similares a aquellas que se pueden realizar utilizando bacterias.

Estas características han hecho a las levaduras las células eucariotas más accesibles desde el punto de vista de la biología molecular. Las levaduras mutantes han resultado importantes para la comprensión de muchos procesos fundamentales en eucariotas, incluyendo la replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN, ensamblaje de proteínas y la regulación de la división celular, tal y como discutiremos en capítulos siguientes. La unidad de la biología celular molecular se presenta clara debido al hecho de que los principios generales de la estructura y función celulares revelados por los estudios de las levaduras se pueden aplicar a todas las células eucariotas.

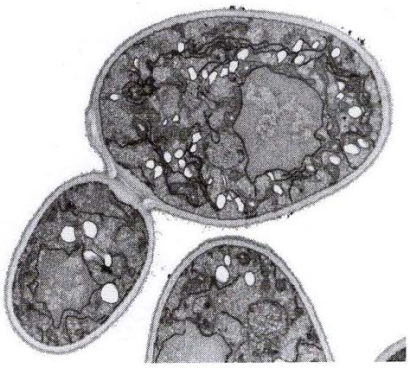


FIGURA 1.15 Micrografía electrónica de transmisión de *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras son el modelo más simple de estudio de las células eucariotas.

Caenorhabditis elegans

Las levaduras unicelulares son modelos importantes para el estudio de las células eucariotas, pero entender el desarrollo de los organismos multicelulares requiere los análisis experimentales de plantas y animales, organismos que son mucho más complejos. El nematodo ***Caenorhabditis elegans*** (**Fig. 1.16**) posee diversas características notables que hacen que sea uno de los modelos más utilizados en los estudios de desarrollo animal y diferenciación celular.

Aunque el genoma de *C. elegans* (aproximadamente 100 millones de pares de bases) es mayor que los eucariotas unicelulares, es más simple y más manejable que los genomas de la mayoría de los animales. Su secuencia ha sido determinada por completo, revelando que el genoma de *C. elegans* contiene aproximadamente 19.000 genes —alrededor de tres veces más codificadores de proteínas que el número de genes de levaduras, y un quinto del número de genes previsibles en humanos—. Biológicamente, *C. elegans* es también un organismo multicelular relativamente simple: Las lombrices adultas solamente se componen de 959 células somáticas, y de 1.000 a 2.000

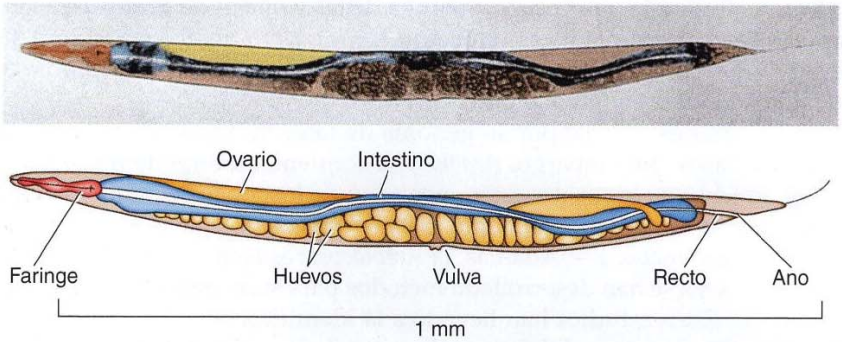


FIGURA 1.16 ***Caenorhabditis elegans.*** El nematodo es ampliamente utilizado para estudios sobre el desarrollo animal. (De J. E. Sulston y H. R. Horvitz, 1977. *Dev. Biol.* 56: 110.)

células germinales. Además, *C. elegans* puede ser reproducida con facilidad y ser sometida a manipulaciones genéticas en el laboratorio.

La simplicidad de *C. elegans* ha permitido que el curso de su desarrollo se haya estudiado en detalle mediante observación microscópica. Estos análisis han trazado satisfactoriamente el origen embrionario y el linaje de todas las células en la lombriz adulta. Los estudios genéticos también han identificado algunas de las mutaciones responsables de anormalidades del desarrollo, conduciendo al aislamiento y descripción de genes claves que controlan el desarrollo y diferenciación del nematodo. Cabe destacar que se han encontrado similares genes que funcionan en animales complejos (incluyendo humanos), resultando *C. elegans* un importante modelo para los estudios del desarrollo animal.

Drosophila melanogaster

Al igual que *C. elegans*, la mosca de la fruta ***Drosophila melanogaster*** (**Fig. 1.17**) ha sido un modelo de organismo crucial en la biología del desarrollo. El genoma de *Drosophila* es de 180 millones de pares de bases, mayor que el de *C. elegans*, pero el genoma de *Drosophila* sólo contiene unos 14.000 genes. Además, el corto ciclo de reproducción (unas 2 semanas) la convierte en un organismo muy útil para los experimentos genéticos. Muchos conceptos fundamentales de la genética —como la relación entre genes y cromosomas— se derivaron de los estudios en *Drosophila* a principios del siglo veinte (véase Cap. 4).

FIGURA 1.17 ***Drosophila melanogaster.*** La mosca de la fruta es un modelo clave en la genética y la biología del desarrollo.

Los exhaustivos análisis genéticos en *Drosophila* han descubierto muchos de los genes que controlan el desarrollo y la diferenciación, siendo los métodos actuales de la biología molecular los que han permitido el análisis en detalle de las funciones de estos genes. Como consecuencia, los estudios de *Drosophila* han permitido avanzar en el entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan el desarrollo animal, particularmente respecto a la formación del cuerpo de organismos multicelulares complejos. Al igual que *C. elegans*, en vertebrados existen genes y mecanismos similares, validando el uso de *Drosophila* como uno de los modelos experimentales más importantes de la biología contemporánea del desarrollo.

Arabidopsis thaliana

El estudio del desarrollo y la biología molecular vegetal es un campo activo y en expansión de considerable importancia económica al igual que de interés intelectual. Desde que los genomas de las plantas cubren una dimensión de complejidad comparable a los genomas animales (véase Tabla 1.2), un modelo óptimo para el estudio del desarrollo vegetal sería un organismo re-

lativamente simple que poseyera alguna de las ventajas de *C. elegans* y *Drosophila*. La pequeña planta con flor ***Arabidopsis thaliana*** (oruga) (**Fig. 1.18**) recoge estos criterios, por lo que se utiliza como modelo para el estudio de la biología molecular en plantas.

Arabidopsis es notable por su genoma de tan sólo unos 125 millones de pares de bases. Sin embargo, *Arabidopsis* contiene un total de unos 26.000 genes, muchos de los cuales están repetidos, de forma que el número de genes únicos es de aproximadamente 15.000 —una complejidad similar a la de *C. elegans* y *Drosophila*—. Además, la *Arabidopsis* es fácil de cultivar en el laboratorio, y ya se han desarrollado métodos para su manipulación genética molecular. Estos estudios han llevado a la identificación de genes implicados en varios aspectos del desarrollo vegetal, como es el desarrollo de las flores. El análisis de estos genes indica la existencia de numerosas similitudes, pero también diferencias notables, entre los mecanismos que controlan el desarrollo de vegetales y animales.

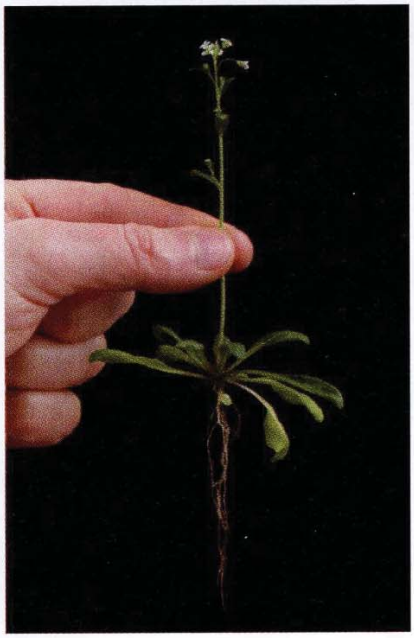


FIGURA 1.18 ***Arabidopsis thaliana.*** *Arabidopsis* es un modelo en el estudio de la biología molecular de las plantas.

Vertebrados

Los animales más complejos son los vertebrados, incluyendo a los humanos y otros mamíferos. El genoma humano se compone aproximadamente de 3 billones de pares de bases —alrededor de 20-30 veces más que los genomas de *C. elegans*, *Drosophila* o *Arabidopsis*— y contiene alrededor de 21.000 genes codificadores de proteínas. Además, el cuerpo humano se compone de más de 200 clases diferentes de tipos de células especializadas. Esta complejidad hace que los vertebrados sean difíciles de estudiar desde el punto de vista de la biología celular y molecular, aunque el mayor interés de las ciencias biológicas nace del deseo de entender el organismo humano. Además, entender muchas de las cuestiones sobre la importancia de la práctica inmediata (p. ej., en medicina) deben estar basadas en estudios de células humanas (o estrechamente relacionadas).

Un avance importante en el estudio de células humanas y de los mamíferos es el crecimiento de células aisladas en cultivo, donde pueden ser manipuladas bajo condiciones de laboratorio controladas. El uso de células cultivadas ha permitido realizar estudios sobre diversos aspectos de la biología celular de los mamíferos, incluyendo experimentos que han iluminado los mecanismos de la replicación del ADN, expresión génica, síntesis y procesamiento de proteínas, y división celular. Además, la habilidad de cultivar células en un medio químico definido ha permitido realizar estudios sobre los mecanismos de señales que normalmente controlan el crecimiento y la diferenciación celular en el organismo intacto.

Las propiedades especializadas de algunos tipos de células altamente diferenciadas han hecho de ellas importantes modelos para el estudio de aspectos determinados de la biología celular. Las células musculares, por ejemplo, están altamente especializadas para realizar la contracción, produciendo fuerza y movimiento. Debido a esta especialización, las células musculares son un modelo crucial para el estudio del movimiento celular a nivel molecular. Otro ejemplo lo proporcionan las células nerviosas (neuronas), que están especializadas en la conducción de señales electroquímicas a larga distancia. En humanos, los axones de las células nerviosas pueden tener más de un metro de largo, y algunos invertebrados, como el calamar, tienen neuronas gigantes con axones de hasta 1 mm de diámetro. Debido a su estructura y función tan especializadas, estas neuronas gigantes han sido importantes modelos en el estudio del transporte de iones a través de la membrana, y del papel del citoesqueleto en el transporte de orgánulos citoplasmáticos.

La rana ***Xenopus laevis*** es un modelo importante para los estudios del desarrollo temprano de los vertebrados. Los huevos de *Xenopus* son nor-

FIGURA 1.19 Huevos de la rana *Xenopus laevis*. Los numerosos huevos de *Xenopus* son útiles para el estudio del desarrollo temprano de los vertebrados. (Cortesía de Michael Danilchik y Kimberly Ray.)

malmente grandes células, con un diámetro aproximado de 1 mm (**Fig. 1.19**). Debido a que estos huevos se desarrollan fuera de la madre, todas las etapas del desarrollo desde el huevo hasta el renacuajo se pueden estudiar con facilidad en el laboratorio. Además, los huevos de *Xenopus* se pueden obtener en grandes cantidades, facilitando el análisis bioquímico. Gracias a estos avances técnicos, se ha utilizado *Xenopus* ampliamente en estudios sobre el desarrollo biológico y ha proporcionado importantes descubrimientos en los mecanismos que controlan el desarrollo, diferenciación y división celular del embrión.

El **pez cebra** (**Fig. 1.20**) posee numerosas ventajas para los estudios genéticos del desarrollo de los vertebrados. Este pequeño pez es fácil de mantener en el laboratorio y se reproduce con rapidez, con un tiempo de generación de 3-4 meses. Además, los embriones se desarrollan fuera de la madre y son transparentes, por lo que las primeras etapas del desarrollo pueden ser observadas con claridad. Se han desarrollado métodos poderosos para facilitar el aislamiento de las mutaciones que afectan al desarrollo del pez cebra, consiguiendo la identificación de varios cientos de estas mutaciones. Ya que el pez cebra es un vertebrado de fácil estudio, promete ser el puente entre los humanos y los sistemas más simples de invertebrados, como *C. elegans* y *Drosophila*.

Entre los mamíferos, el ratón es el más manejable para los análisis genéticos, lo cual se facilitará con la reciente finalización de la secuenciación del genoma del ratón. Aunque las dificultades técnicas de estudio de la genética del ratón (comparada, p. ej., a la genética de las levaduras o *Drosophila*) son inmensas, se han identificado varias mutaciones que afectan al desarrollo del ratón. Más importantes aún son los recientes avances en la biología molecular que han permitido la producción de ratones obtenidos mediante ingeniería genética, en los que se han introducido genes mutantes específicos en la línea germinal del ratón, por lo que sus efectos en el desarrollo u otros aspectos de la función celular pueden ser estudiados en el contexto del animal completo. La manejabilidad del ratón como modelo del desarrollo humano se corresponde con el hecho de que las mutaciones en genes homólogos dan lugar a defectos del desarrollo similares en ambas especies; el piebaldismo (un defecto en la pigmentación) que ofrece es un ejemplo claro (**Fig. 1.21**).

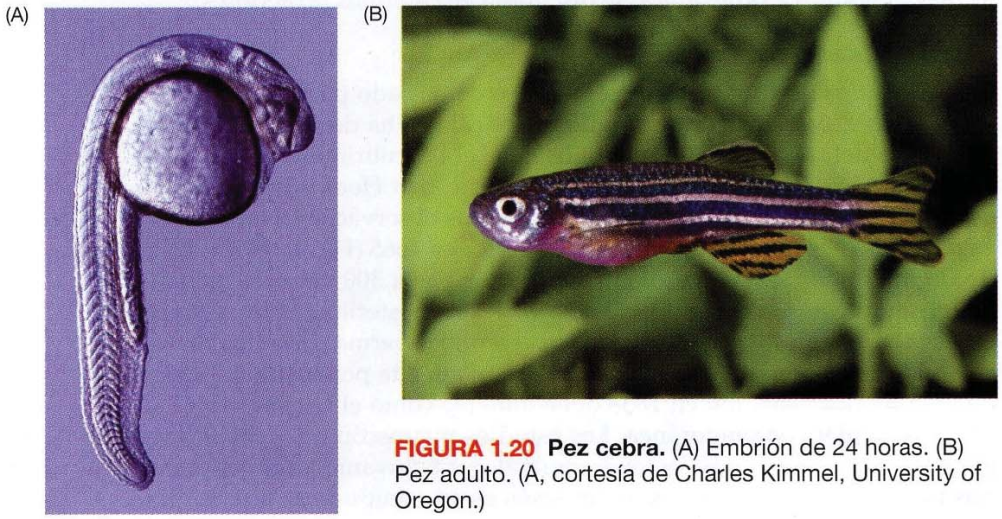


FIGURA 1.20 Pez cebra. (A) Embrión de 24 horas. (B) Pez adulto. (A, cortesía de Charles Kimmel, University of Oregon.)

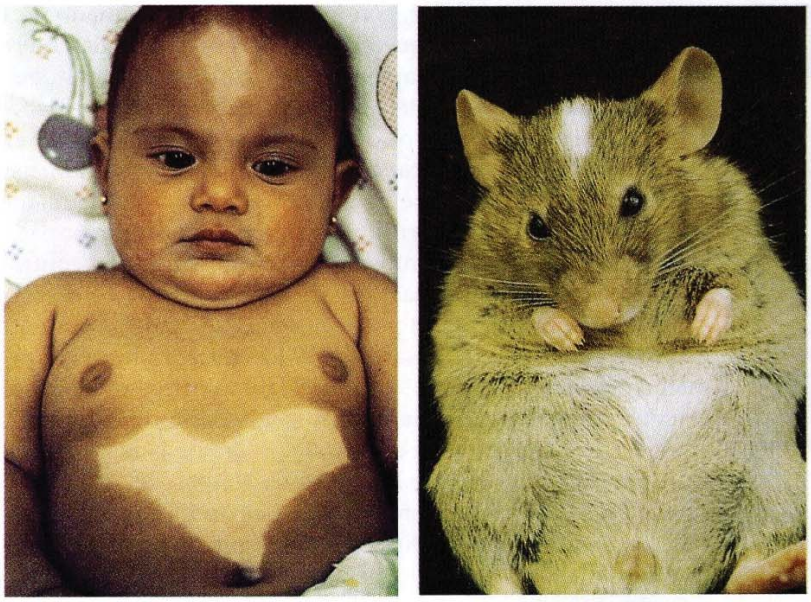


FIGURA 1.21 El ratón como modelo del desarrollo humano. Niño y ratón muestran defectos similares en la pigmentación (piebaldismo) como resultado de mutaciones en un gen necesario para la migración normal de los melanocitos (células responsables de la pigmentación de la piel) durante el desarrollo embrionario. (Cortesía de R. A. Fleischman, Markey Cancer Center, University of Kentucky.)

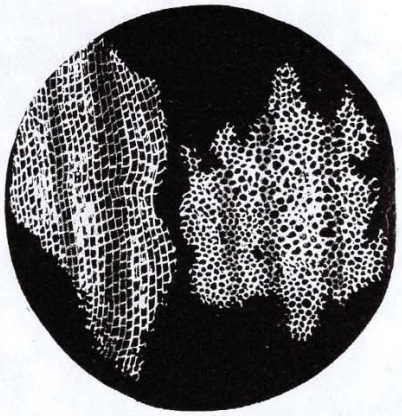


FIGURA 1.22 Estructura celular del corcho. Una reproducción de un dibujo de Robert Hooke de una lámina de corcho examinada con un microscopio óptico. Las «células» que Hooke observó fueron en realidad las paredes celulares que quedan cuando las células han muerto hace tiempo.

Instrumentos de la biología celular

Como en todas las ciencias experimentales, la investigación en biología celular depende de los métodos de laboratorio que se puedan utilizar para estudiar la estructura y función celulares. Muchos avances importantes sobre el funcionamiento de las células han conducido directamente al desarrollo de nuevos métodos de investigación. La apreciación de los instrumentos experimentales disponibles para el biólogo celular resulta por tanto crítica para entender el estado actual y futuro de las direcciones de este área de la ciencia que se mueve con tanta rapidez. Algunos de los métodos generales importantes de la biología celular están descritos en secciones siguientes. Otros avances experimentales, que incluyen los métodos de la biología molecular, genómica y proteómica, se discutirán en capítulos posteriores.

Microscopia óptica

Debido a que la mayoría de las células son demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista, el estudio de las células ha dependido primordialmente del uso del microscopio. Es más, el descubrimiento real de las células surgió del desarrollo del microscopio: Robert Hooke fue el primero que acuñó el término de «célula» siguiendo sus observaciones de una pieza de corcho con un simple microscopio óptico en 1665 (**Fig. 1.22**). Utilizando un microscopio que ampliaba los objetos hasta 300 veces su tamaño real, Antony van Leeuwenhoek, en 1670 y años posteriores, fue capaz de observar diferentes tipos de células, incluyendo esperma, glóbulos rojos y bacterias. La propuesta de la teoría celular planteada por Matthias Schleiden y Theodor Schwann en 1838 debe tomarse como el nacimiento de la biología celular contemporánea. Los estudios microscópicos de tejido vegetal por Schleiden y los de tejido animal por Schwann condujeron a la misma conclusión: Todos los organismos están compuestos por células.

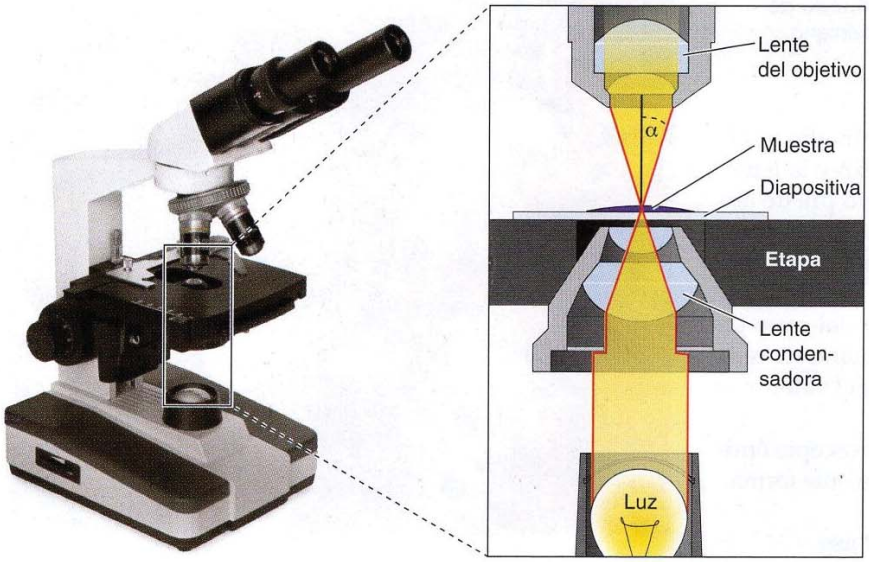


FIGURA 1.23 Apertura numérica. La luz se enfoca en la muestra mediante la lente condensadora y se recoge en la lente del objetivo del microscopio. La apertura numérica está determinada por el ángulo del cono de la luz que entra en el objetivo de la lente (α) y por el índice de refracción del medio (normalmente agua o aceite) entre la lente y la muestra.

Más tarde, se reconoció que las células no se forman *de novo* sino que emergen únicamente por la división de las células preexistentes. Por tanto, la célula consiguió su actual reconocimiento como la unidad fundamental de todos los organismos vivos debido a las observaciones realizadas con el microscopio óptico.

El microscopio óptico continúa siendo un instrumento básico para los biólogos celulares, que con mejoras técnicas permiten la visualización de los detalles aumentados de la estructura celular. Los microscopios ópticos contemporáneos son capaces de aumentar los objetos hasta unas mil veces. Dado que la mayoría de las células se encuentran entre 1 y 100 µm de diámetro, pueden ser observadas en el microscopio óptico, como pueden ser también algunos de los orgánulos subcelulares, como el núcleo, los cloroplastos y las mitocondrias. Sin embargo, el microscopio óptico no es lo suficientemente poderoso para observar pequeños detalles de la estructura celular, cuya **resolución** —la capacidad de un microscopio para distinguir objetos separados por pequeñas distancias— es mucho más importante que el aumento. Las imágenes se pueden aumentar tanto como se desee (p. ej., mediante la proyección en una pantalla grande), pero tal aumento no incrementa el nivel de detalle que se puede observar.

La difracción de la luz limita la resolución del microscopio óptico hasta aproximadamente 0,2 µm; dos objetos separados por menos de esta distancia aparecen como una única imagen, en lugar de distinguirse una de otra. Esta limitación teórica de la microscopia óptica está determinada por dos factores —la longitud de onda (λ) de la luz visible y el poder de captación de luz de las lentes del microscopio (apertura numérica, *AN*)— de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Resolución} = \frac{0{,}61\lambda}{AN}$$

La longitud de onda de la luz visible es de 0,4 a 0,7 µm, por lo que el valor de λ se calcula en 0,5 µm para el microscopio óptico. La apertura numérica puede preverse como el tamaño del cono de luz que entra en la lente del microscopio después de pasar a través de la muestra (**Fig. 1.23**). Esto se obtiene de la ecuación

$$AN = \eta \sin \alpha$$

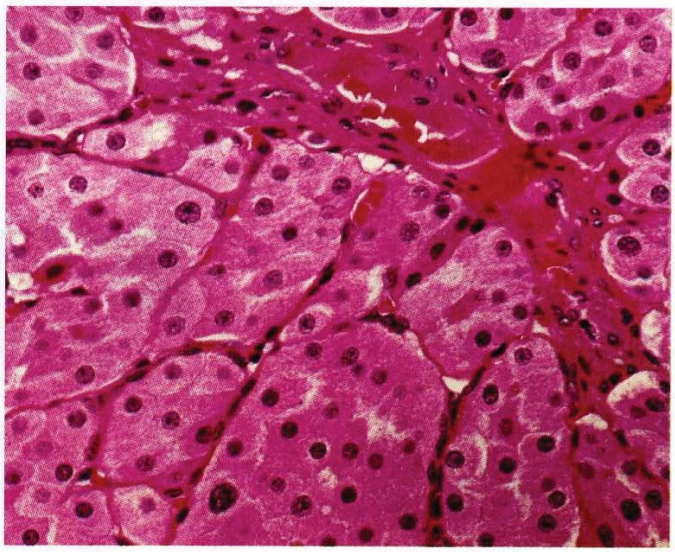


FIGURA 1.24 Micrografía de campo luminoso de tejido teñido. Sección de un tumor renal benigno.

donde η es el índice de refracción del medio a través del cual la luz viaja entre la muestra y la lente. El valor de η para el aire es de 1,0, pero puede aumentar hasta un máximo aproximado de 1,4 utilizando una lente inmersa en aceite para ver la muestra a través de una gota de aceite. El ángulo α corresponde a la mitad de la anchura del cono de luz recogido por la lente. El valor máximo de α es de 90°, en el que el sen α = 1, por lo que el valor más alto de la apertura numérica es de 1,4.

El límite teórico de resolución del microscopio óptico se puede, por tanto, calcular de la siguiente forma:

$$\text{Resolución} = \frac{0{,}61 \times 0{,}5}{1{,}4} \; 0{,}22\ \mu\text{m}$$

Los microscopios que llegan a este nivel de resolución se consiguieron fabricar a finales del siglo XIX, alcanzando el límite teórico de resolución con la microscopia óptica. Sin embargo, como se discute más adelante, los nuevos enfoques han dado lugar al desarrollo de métodos novedosos (microscopio de superresolución) que ha aumentado considerablemente el poder de resolución de la fluorescencia superando este límite.

Rutinariamente se utilizan diferentes tipos de microscopia óptica para estudiar varios aspectos de la estructura celular. El más simple es el **microscopio de campo luminoso**, en el que la luz pasa directamente a través de la célula y en el que la habilidad para distinguir las diferentes partes de la célula depende del contraste que se obtiene de la absorción de la luz visible por los componentes celulares. En muchos casos, las células se tiñen con tintes que reaccionan con proteínas y ácidos nucleicos para resaltar el contraste entre las diferentes partes de la célula. Antes de teñir, las muestras son normalmente tratadas con fijadores (como el alcohol, ácido acético o formaldehído) para estabilizar y conservar sus estructuras. El examen de los tejidos fijados y teñidos mediante el microscopio de campo luminoso es la práctica estándar para analizar las muestras de tejidos en los laboratorios histológicos (**Fig. 1.24**). Tales procedimientos de tinción matan, no obstante, a las células y por tanto no resultan apropiados para muchos experimentos en donde se desea una observación de células vivas.

Sin la tinción, el paso directo de la luz no proporciona el contraste suficiente para distinguir muchas de las partes de la célula, limitando la utilidad del microscopio de campo luminoso. No obstante, las variaciones ópticas del microscopio óptico se pueden utilizar para potenciar el contraste entre las ondas de luz que pasan a través de regiones de la célula con diferentes densidades. Los dos métodos más comunes para la visualización de células vivas son la **microscopia de contraste de fases** y la **microscopia de interferencia-contraste diferencial** (**Fig. 1.25**). Los dos tipos de microscopia utilizan sistemas ópticos que convierten las variaciones de densidad o grosor entre las diferentes partes de la célula en diferencias de contraste que se

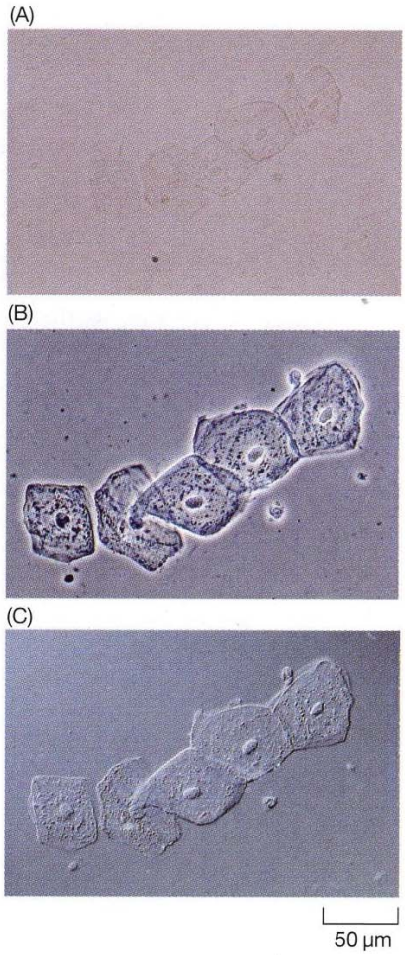


FIGURA 1.25 Observación microscópica de células vivas. Microfotografías de células bucales humanas obtenidas con (A) campo luminoso, (B) contraste de fases y (C) microscopia de interferencia-contraste diferencial. (Cortesía de Mort Abramowitz, Olympus America, Inc.)

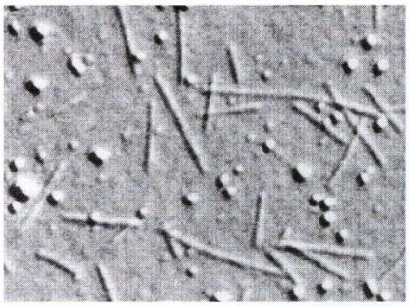


FIGURA 1.26 Microscopia de interferencia-contraste diferencial potenciada con vídeo. El procesamiento de una imagen electrónica permite la visualización de microtúbulos individuales. (Cortesía de E. D. Salmon, University of North Carolina, Chapel Hill.)

pueden apreciar en la imagen final. En la microscopia de campo luminoso, las estructuras transparentes (como el núcleo) presentan poco contraste porque absorben pobremente la luz. Sin embargo, la luz disminuye cuando pasa a través de estas estructuras, por lo que su fase se altera en comparación a la luz que ha pasado a través del citoplasma que las rodea. Las microscopias de contraste de fases y de interferencia-contraste diferencial convierten estas diferencias de fase en diferencias de contraste, mejorando de ese modo las imágenes de las células vivas sin teñir.

El poder del microscopio óptico se ha extendido mediante el uso de cámaras de vídeo y ordenadores para el análisis y procesamiento de imágenes. Tales sistemas de procesamiento de imágenes pueden potenciar sustancialmente el contraste de las imágenes obtenidas con el microscopio óptico, permitiendo la visualización de objetos pequeños que de otra forma no hubieran podido ser detectados. Por ejemplo, la microscopia de interferencia contraste diferencial potenciada con vídeo ha permitido la visualización del movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos, que son filamentos de proteínas citoesqueléticas con un diámetro de tan solo 0,025 µm (**Fig. 1.26**). Sin embargo, esta potenciación no consigue llegar al límite teórico de resolución del microscopio óptico, aproximadamente 0,2 µm. Por tanto, aunque la potenciación por vídeo permite la visualización de los microtúbulos, aparecen como imágenes turbias a menos de 0,2 µm de diámetro y un microtúbulo individual no puede ser distinguido de un haz de estructuras adyacentes.

La microscopia óptica se ha llevado al nivel del análisis molecular mediante métodos que marcan moléculas específicas y que pueden ser visualizadas dentro de las células. Genes específicos o transcritos de ARN se pueden detectar mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos de secuencia complementaria, y las proteínas pueden detectarse usando anticuerpos apropiados (véase Cap. 4). Tanto las sondas de ácidos nucleicos como los anticuerpos se pueden señalar con variedad de marcadores que permitan su visualización en el microscopio óptico, permitiendo determinar la localización de moléculas específicas en células individuales.

La **microscopia de fluorescencia** se utiliza para el estudio de la distribución intracelular de las moléculas (**Fig. 1.27**). Se utiliza una tinción fluorescente para marcar las moléculas que interesan tanto en células fijadas o vivas. La tinción fluorescente es una molécula que absorbe la luz a una longitud de onda y emite luz a una segunda longitud de onda. Esta fluorescencia se detecta mediante la iluminación de la muestra con una luz de una longitud de onda que excita al tinte fluorescente, usándose más tarde filtros apropiados para detectar la longitud de onda específica que emite el tinte. La microscopia fluorescente se puede utilizar para estudiar una gran variedad de moléculas dentro de las células. Una de las aplicaciones más frecuentes es la señalización de anticuerpos con tintes fluorescentes dirigidos contra una proteína específica, de manera que se pueda determinar la distribución intracelular de la proteína.

Un avance revolucionario en la microscopia de fluorescencia ha sido el uso de la **proteína verde fluorescente (GFP: *green fluorescent protein*)** de las medusas para visualizar proteínas en el interior de células vivas. La GFP puede fusionarse con cualquier proteína de interés mediante métodos estándar de

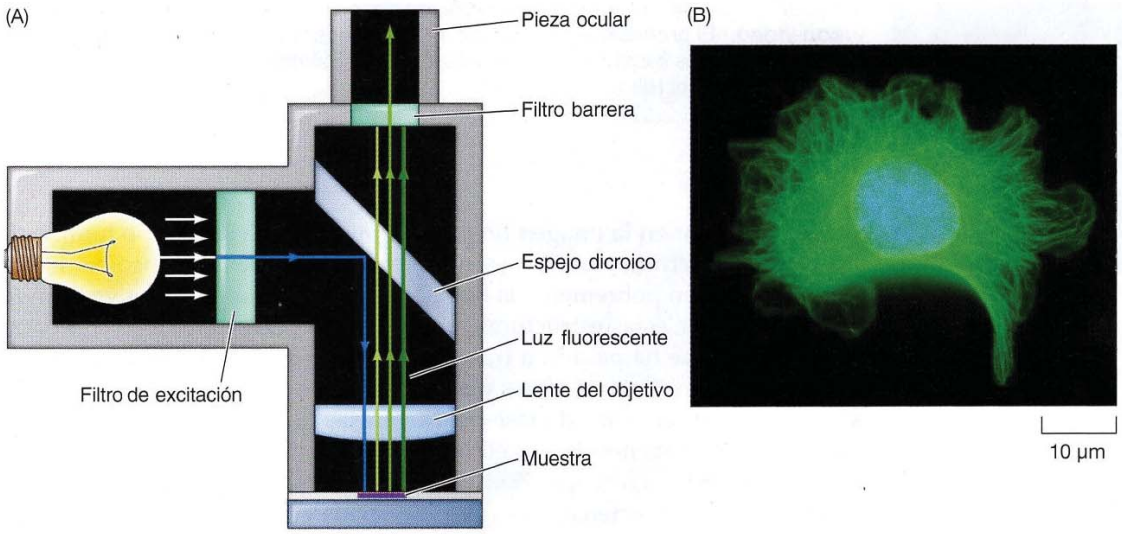


FIGURA 1.27 Microscopia de fluorescencia. (A) La luz pasa a través de un filtro de excitación para seleccionar la luz de la longitud de onda (p. ej., azul) que excita el tinte fluorescente. Después un espejo dicroico desvía la luz excitada hacia la muestra. La luz fluorescente emitida por la muestra (p. ej., verde) pasa a través de un espejo dicroico y un segundo filtro (el filtro barrera) para seleccionar la luz de longitud de onda emitida por el tinte. (B) Micrografía fluorescente de un pulmón de tritón en el que el ADN está teñido de azul y los microtúbulos en el citoplasma de verde.

ADN recombinante, y la proteína marcada con GFP puede a continuación introducirse en células y detectarse por microscopia de fluorescencia, sin necesidad de fijación y tinción de las células tal y como se necesitaría para la detección de proteínas mediante el uso de anticuerpos. Gracias a su versatilidad, el uso de GFP está muy extendido en biología celular, y se ha empleado para estudiar la localización de una amplia gama de proteínas en el interior de células vivas (**Fig. 1.28**). Muchas proteínas fluorescentes relacionadas con emisiones azules, amarillas o rojas también se encuentran disponibles, expandiendo aún más la utilidad de esta técnica al permitir visualizar varias proteínas simultáneamente.

Se han desarrollado una variedad de métodos para seguir el movimiento y las interacciones de proteínas marcadas con GFP en el interior de células vivas. Un método ampliamente utilizado para estudiar los movimientos de proteínas marcadas con GFP es la **recuperación de fluorescencia tras el fotoblanqueado (FRAP: *fluorescente recovery after photobleaching*)** (**Fig. 1.29**). En esta técnica, una región de interés en una célula que expresa una proteína marcada con GFP es blanqueada mediante la exposición a una luz de alta intensidad. La fluorescencia se recupera a lo largo del tiempo debido al movimiento de moléculas marcadas con GFP no blanqueadas hacia la región blanqueada, permitiendo determinar la tasa a la que la proteína se mueve en el interior de la célula.

Las interacciones de dos proteínas entre sí en el interior de una célula pueden analizarse mediante una técnica denominada **transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET: *fluorescence resonance energy transfer*)** (**Fig. 1.30**). En los experimentos FRET, las dos proteínas de interés se unen a diferentes marcadores fluorescentes, como dos variantes de la GFP. Las variantes de GFP son seleccionadas para absorber y emitir luz de diferentes longitudes de onda, de forma que la luz emitida por una de las variantes GFP excita a la segunda. La interacción entre dos proteínas puede entonces detectarse, mediante la iluminación de la célula con una luz de longitud de onda que excita la primera variante de GFP y analizar la longi-

◆ Los nanocristales semiconductores (denominados puntos cuánticos) se emplean cada vez más en lugar de los marcadores fluorescentes en muchas aplicaciones dentro de la microscopia de fluorescencia. Los puntos cuánticos fluorecen con mayor intensidad y son más estables que los marcadores fluorescentes tradicionales.

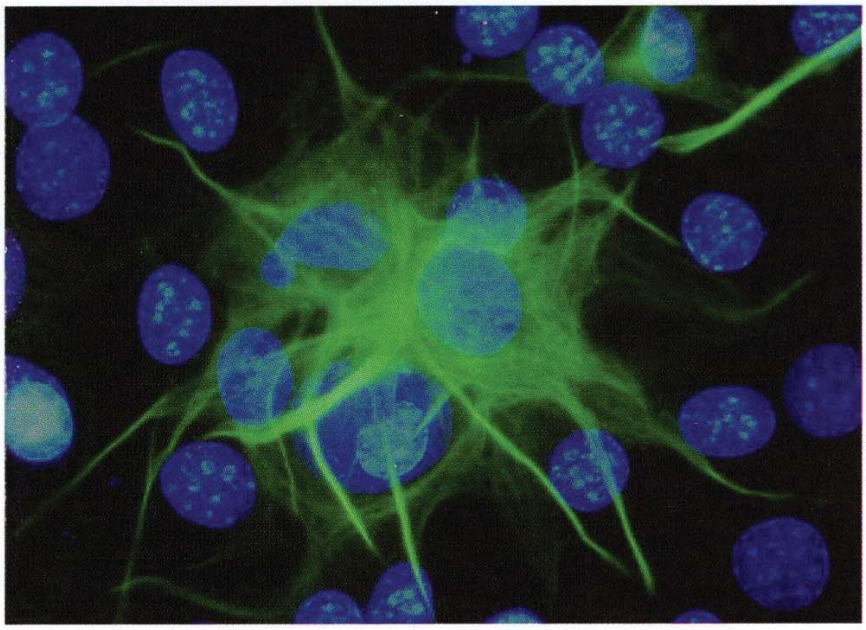


FIGURA 1.28 Microscopia de fluorescencia de una proteína marcada con GFP. Una proteína asociada a microtúbulos fusionada con GFP fue introducida en neuronas murinas en cultivo y visualizada mediante microscopia de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul. (De A. Cariboni, 2004. *Nature Cell Biol.* 6:929.)

tud de onda de la luz emitida. Si las proteínas unidas a estas variantes de GFP interaccionan en el interior de la célula, las moléculas fluorescentes se encontrarán cerca y la luz emitida por la primera variante GFP excitará a la segunda variante, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda característica de la segunda variante GFP.

Las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia convencional son borrosas como consecuencia de la fluorescencia no enfocada. Estas imágenes pueden ser mejoradas mediante un tratamiento informático denominado desconvolución de imágenes, en el que un ordenador analiza las imágenes obtenidas de diferentes profundidades de foco y genera una imagen más nítida como cabría esperar a partir de un único punto focal. Alternativamente, la **microscopia confocal** permite la obtención de imágenes de contraste y detalle incrementados, mediante el análisis de la fluorescencia de un solo punto de la muestra. Un pequeño punto de luz, normalmente producido por un láser, se enfoca en la muestra a una profundidad determinada. La luz fluorescente emitida se recoge utilizando un detector, como una videocámara. Antes de que la luz emitida alcance el detector, ésta debe atravesar el agujero de una aguja (llamado apertura focal) situada precisamente en el punto donde la luz emitida desde la profundidad

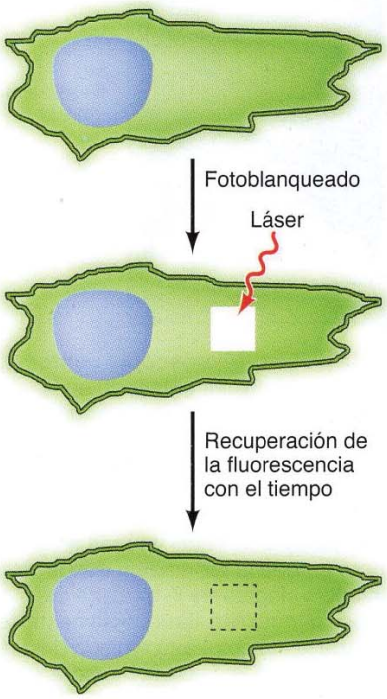


FIGURA 1.29 Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueado (FRAP). Una región de una célula que expresa una proteína marcada con GFP es blanqueada mediante láser. La fluorescencia se recupera con el tiempo a medida que moléculas marcadas con GFP no blanqueado difunden hacia la región blanqueada. La tasa de recuperación de la fluorescencia proporciona, por tanto, una medida de la tasa de movimiento de proteína en el interior celular.

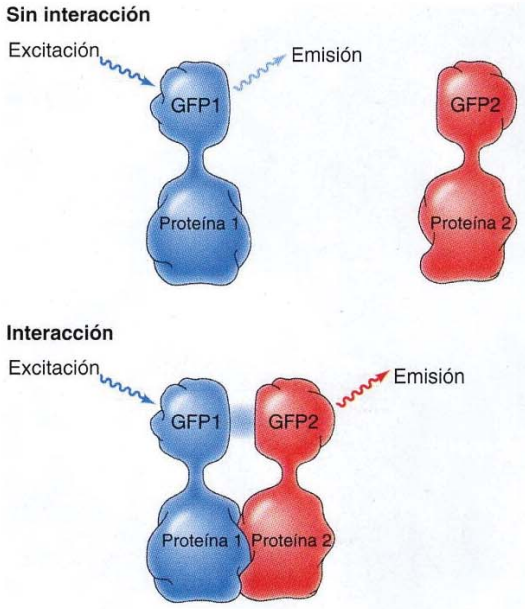


FIGURA 1.30 Transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Se fusionan dos proteínas a dos variantes diferentes de la GFP (GFP1 y GFP2) con distintas longitudes de onda para la excitación y la emisión, seleccionadas de tal forma que la luz emitida por GFP1 excita a GFP2. A continuación, las células son iluminadas con una luz de longitud de onda tal que excita a GFP1. Si las proteínas no interaccionan, la luz emitida por GFP1 será detectada. Sin embargo, si las proteínas sí interaccionan, GFP1 excitará a GFP2, y la luz emitida por GFP2 será detectada.

elegida de la muestra es enfocada (**Fig. 1.31**). Por tanto, solamente la luz emitida desde el plano de enfoque es capaz de alcanzar el detector. El barrido a lo largo de la muestra genera una imagen del plano de enfoque en dos dimensiones, una imagen mucho más detallada que la obtenida con la microscopia fluorescente habitual (**Fig. 1.32**). Además, es posible fundir una serie de imágenes obtenidas a distintas profundidades para reconstruir una imagen tridimensional de la muestra.

La **microscopia de excitación multifotónica** es una alternativa a la microscopia tridimensional que también puede aplicarse a las células vivas. La muestra se ilumina con una luz de una longitud de onda tal que la excitación del tinte fluorescente requiera la absorción simultánea de dos o más fotones (**Fig 1.33**). La probabilidad de que los dos fotones exciten simultáneamente al tinte fluorescente solamente es importante en el punto de la muestra en el que el láser está enfocado, de tal manera que la fluorescencia sólo se emite desde el plano de enfoque de la luz. Esta potente excitación proporciona automáticamente una solución tridimensional, sin necesidad de que la luz emitida atraviese la apertura de una aguja, como en la microscopia confocal. Además, la localización de la excitación reduce el daño de la muestra, permitiendo imágenes tridimensionales de células vivas.

Microscopia electrónica

Debido a la limitada resolución del microscopio óptico, el análisis de los detalles de la estructura celular ha necesitado una técnica de microscopia mucho más poderosa, llamada microscopia electrónica, que fue desarrollada en los años 1930 y aplicada por primera vez a muestras biológicas por Albert Claude, Keith Porter y George Palade en los años 1940 y 1950. El microscopio electrónico puede alcanzar una resolución mucho mayor que la obtenida con el microscopio óptico puesto que la longitud de onda de los electrones es menor que la de la luz. La longitud de onda de los electrones en un microscopio electrónico puede ser de hasta 0,004 nm —alrededor de 100.000 veces más corta que la longitud de onda de la luz visible—. Teóricamente, esta longitud de onda puede alcanzar una resolución de 0,002 nm, pero tal resolución no ha podido obtenerse en la práctica, puesto que no solo está determinada por la longitud de onda sino también por la apertura numérica de la lente del microscopio. La apertura numérica es un factor limi-

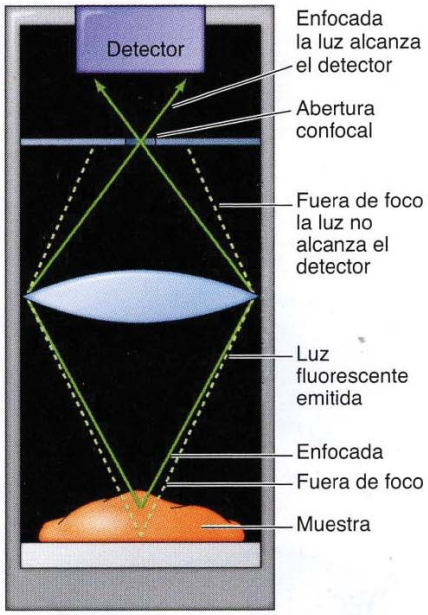


FIGURA 1.31 Microscopia confocal. Un punto de luz es enfocado en la muestra a una distancia determinada, y la luz fluorescente emitida se recoge en un detector. Antes de alcanzar el detector, la luz fluorescente emitida por la muestra debe pasar a través de una apertura confocal situada en el punto en que la luz emitida desde la distancia elegida de la muestra se enfoca. Como resultado, solamente se detecta la luz enfocada emitida desde la distancia elegida de la muestra.

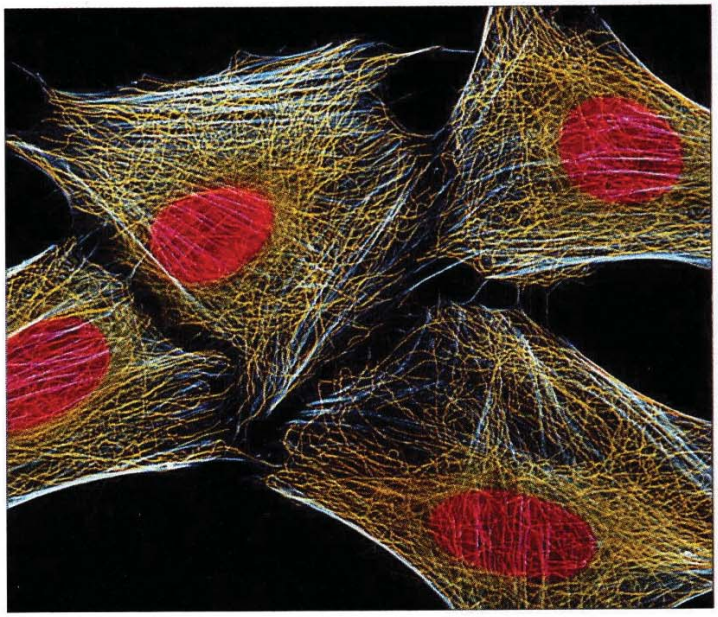


FIGURA 1.32 Micrografía confocal de células humanas. Los microtúbulos están teñidos con colorante fluorescente amarillo, los filamentos de actina están teñidos de azul y los núcleos de rojo.

tante para la microscopia electrónica puesto que las propiedades inherentes de las lentes electromagnéticas limitan sus ángulos de apertura alrededor de 0,5 grados, correspondientes a aberturas numéricas de solo 0,01. Por tanto, bajo condiciones óptimas, el poder de resolución del microscopio electrónico es aproximadamente de 0,2 nm. Además, la resolución que se puede obtener con muestras biológicas está limitada por la falta de contraste inherente. En consecuencia, en muestras biológicas el límite práctico de resolución para el microscopio electrónico es desde 1 a 2 nm. Aunque esta resolución es mucho menor que la predicha por la longitud de onda de los electrones, representa una mejora de más de cien veces del poder de resolución del microscopio óptico.

En el estudio de las células se utilizan dos tipos de microscopia electrónica —transmisión y barrido—. En principio, la **microscopia electrónica de transmisión** es similar a la observación de células teñidas con sales de metales pesados, que proporcionan contraste mediante los electrones dispersos. Un haz de electrones pasa a través de la muestra y se enfoca para formar una imagen en una pantalla fluorescente. Los electrones que chocan con un ión de metal pesado cuando pasan por la muestra se reflejan y no contribuyen a la imagen final, de tal forma que las zonas teñidas de la muestra aparecen oscuras.

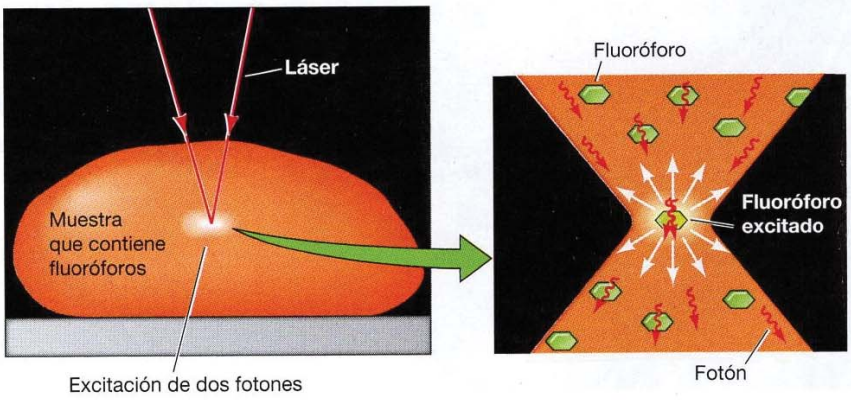


FIGURA 1.33 Microscopia por excitación de dos fotones. Se requiere la absorción simultánea de dos fotones para excitar el tinte fluorescente. Esto sólo sucede en el punto de la muestra donde se enfoca la luz, de tal forma que la luz fluorescente sólo se emite desde la distancia elegida de la muestra.

Las muestras que se van a analizar por microscopia de transmisión de electrones se pueden preparar con tintes positivos o negativos. En la tinción positiva, las muestras de tejido se cortan en secciones finas y se tiñen con sales de metales pesados (como el tetróxido de osmio, acetato de uranilo y citrato de plomo) que reaccionan con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos iones de metales pesados se unen a gran variedad de estructuras celulares, que aparecen oscuras en la imagen final (**Fig. 1.34**). Los procedimientos de tinción positiva también se pueden utilizar para identificar macromoléculas específicas dentro de las células. Por ejemplo, los anticuerpos marcados con metales pesados densos en electrones (como partículas de oro) se utilizan con frecuencia para determinar la localización subcelular de proteínas específicas con el microscopio electrónico. Este método es similar al uso de anticuerpos marcados con tintes fluorescentes en la microscopia fluorescente. Las vistas tridimensionales de estructuras con resoluciones de 2-10 nm también pueden obtenerse empleando la técnica de **tomografía electrónica**, que genera imágenes tridimensionales mediante análisis informático de múltiples imágenes bidimensionales obtenidas a partir de una gama de vistas desde distintas direcciones.

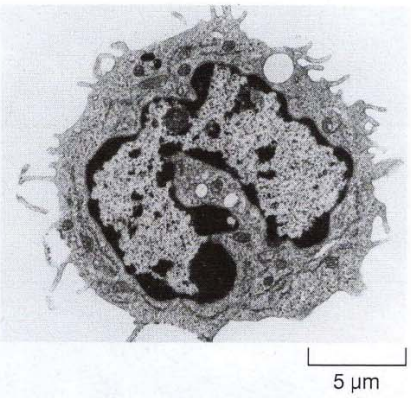


FIGURA 1.34 Tinción positiva. Micrografía de transmisión de electrones de un glóbulo blanco teñido positivamente por sales de metales pesados.

La tinción negativa resulta útil para la visualización de estructuras biológicas intactas, como las bacterias, los orgánulos subcelulares aislados, y macromoléculas (**Fig. 1.35**). En este método, la muestra biológica se deposita en una lámina, permitiendo que una gota de metal pesado rodee su superficie. La muestra sin teñir se rodea con una lámina densa en electrones, produciendo una imagen en la que la muestra aparece clara en contra de un fondo oscuro.

El **sombreado de metal** es otra técnica que se utiliza en la microscopia electrónica de transmisión para visualizar la superficie de estructuras subcelulares aisladas o macromoléculas (**Fig. 1.36**). La muestra se cubre con una fina capa de metal evaporado, como el platino. Se pulveriza el metal en la muestra desde un determinado ángulo, de tal manera que las superficies de la muestra que se encuentran de frente al pulverizador de moléculas de metal evaporadas se cubren más que las otras. Esta diferencia de envoltura crea un efecto de sombra, dando a la muestra una apariencia tridimensional en las micrografías electrónicas.

La preparación de las muestras mediante la **separación por congelación o criofractura**, en combinación con el sombrado de metal, ha resultado particularmente importante en los estudios de la estructura de la membrana. Las muestras se congelan en nitrógeno líquido (a –196 °C) y se separan con el filo de un bisturí. El proceso con frecuencia separa la bicapa lipídica, mostrando

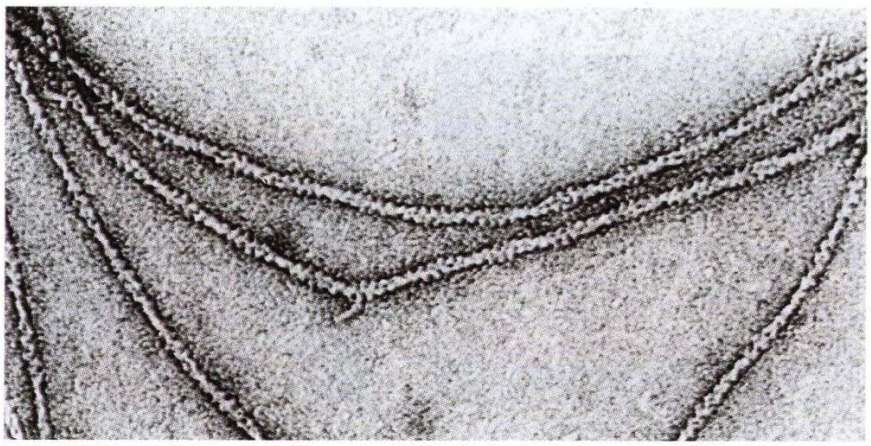


FIGURA 1.35 Tinción negativa. Micrografía de transmisión de electrones de filamentos de actina teñidos negativamente. (Cortesía de Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center.)

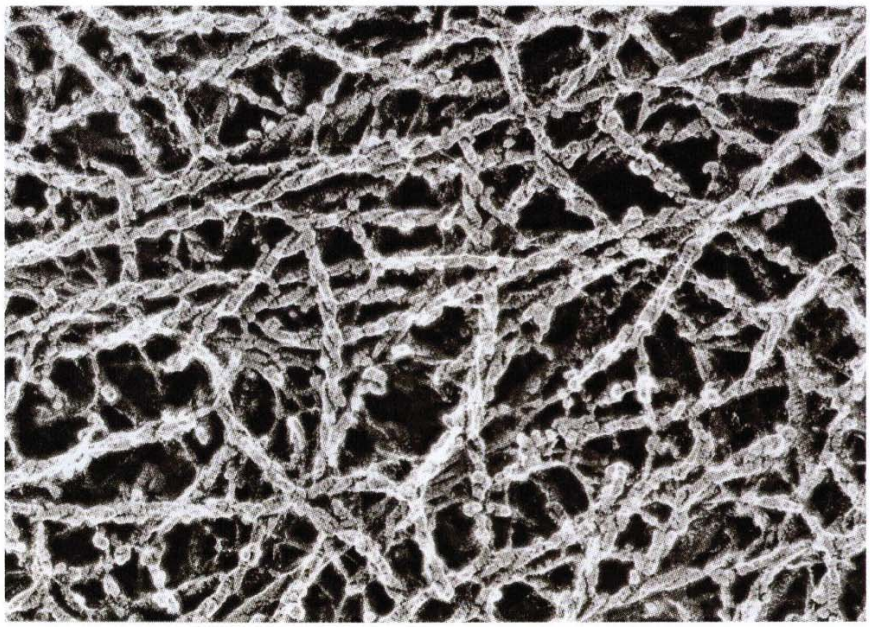


FIGURA 1.36 Sombreado de metal. Micrografía electrónica de filamentos de actina/miosina del citoesqueleto preparada mediante sombreado de metal.

las caras interiores de la membrana celular (**Fig. 1.37**). La muestra se sombrea más tarde con platino, y el material biológico se disuelve en ácido, produciéndose una réplica de metal de la superficie de la muestra. El examen de tales réplicas en el microscopio electrónico revela muchas alteraciones de la superficie, que corresponden a las proteínas que ocupan la bicapa lipídica. Una variación de la separación por congelación llamada grabado por congelación permite la observación de las superficies externas de las membranas celulares además de sus caras internas.

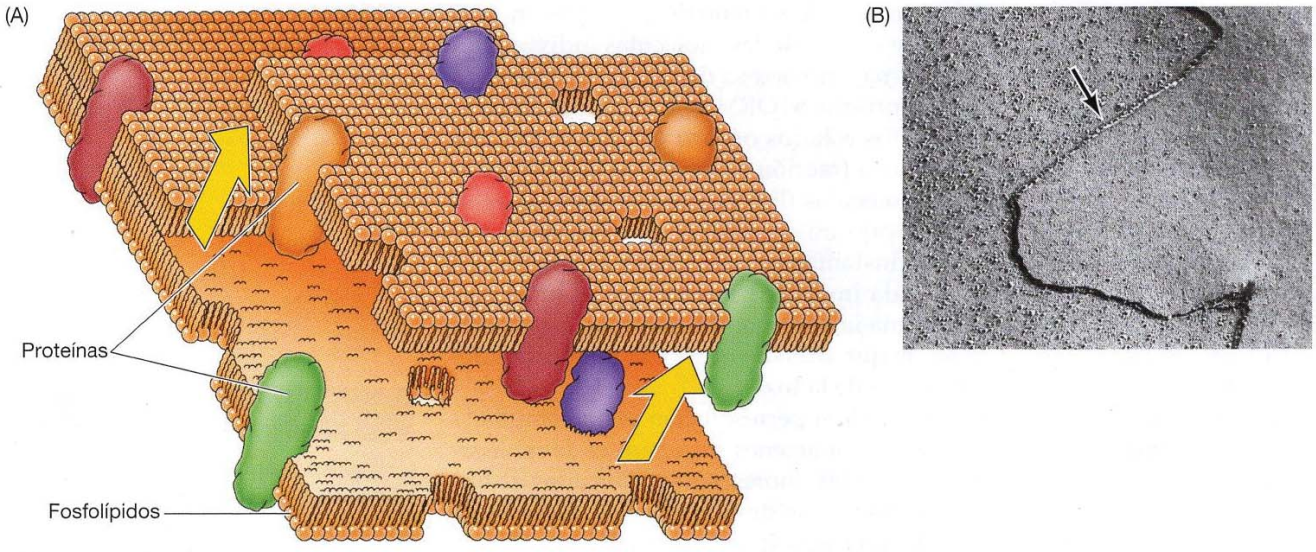


FIGURA 1.37 Separación por congelación. (A) La separación por congelación divide la bicapa lipídica, dejando las proteínas embebidas en la membrana asociadas a una de las dos partes de la membrana. (B) Micrografía de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes separadas por congelación. Las proteínas que cubren la bicapa aparecen como partículas intermembranosas (flecha).

El segundo tipo de microscopia electrónica, la **microscopia electrónica de barrido**, se utiliza para obtener una imagen tridimensional de las células (**Fig. 1.38**). En la microscopia electrónica de barrido el haz de electrones no pasa a través de la muestra. En su lugar, la superficie de la célula se recubre de un metal pesado, y se utiliza un haz de electrones que barre toda la muestra. Los electrones aislados o emitidos por la superficie de la muestra se recogen para generar una imagen tridimensional a la vez que el haz de electrones se mueve a lo largo de la célula.

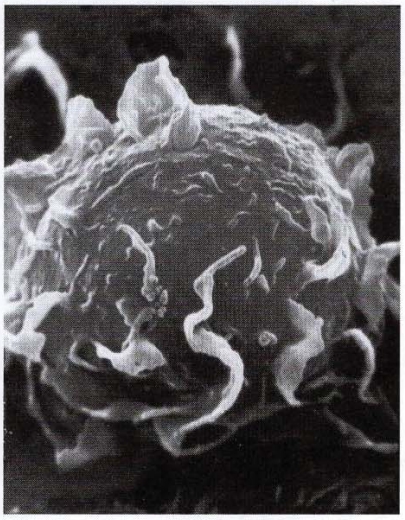


FIGURA 1.38 Microscopia electrónica de barrido. Micrografía electrónica de barrido de un macrófago, donde el haz de electrones no pasa a través de la muestra.

Microscopia óptica de superresolución

Aunque la microscopia electrónica proporciona más resolución que la microscopia óptica, esta presenta inconvenientes. Los microscopios electrónicos son caros y presentan dificultades técnicas para operar, los procedimientos de fijación y la tinción necesarios en la microscopia electrónica pueden introducir artefactos, y el microscopio electrónico no se puede utilizar para el examen de especímenes vivos. Un avance interesante de los últimos años ha sido el desarrollo de técnicas de **microscopia óptica de superresolución** que rompen la barrera de difracción y aumentan la resolución de la microscopia de fluorescencia en un rango de 10-100 nm: unas diez veces menor que el límite teórico de la resolución del microscopio óptico.

Varios métodos de microscopia óptica de superresolución se han desarrollado basándose en el uso de sondas fluorescentes que desplazan el límite de resolución desde la longitud de la onda de la luz visible hasta el nivel molecular. El método conocido como STORM (Microscopia de Reconstrucción Óptica Estocástica), desarrollado en 2006 y con una resolución de aproximadamente 20 nm, proporciona un buen ejemplo. El principio en que se basa STORM y otros métodos relacionados consiste en producir alta resolución mediante la compilación de imágenes individuales de miles de millones de moléculas fluorescentes individuales (**Fig. 1.39**). En la microscopia de fluorescencia estándar, todas las sondas fluorescentes en una muestra experimentan el fenómeno de la fluorescencia al mismo tiempo. Las imágenes fluorescentes de las moléculas individuales se superponen para producir una imagen borrosa de resolución limitada por la difracción de la luz. Por el contrario, STORM utiliza sondas fluorescentes que pueden cambiar entre los estados oscuro y fluorescente. En cualquier momento, sólo una pequeña fracción aleatoria de las sondas es fluorescente, de manera que las moléculas fluorescentes individuales se pueden resolver una de la otra. La captura de muchas de estas imágenes con el tiempo produce una serie de instantáneas, con diferentes moléculas individuales que emiten luz en cada imagen. Estas múltiples imágenes pueden ser usadas para construir una imagen compuesta cuya resolución está limitada por la precisión con la que se encuentra cada molécula fluorescente, en lugar de por la difracción de la luz.

Los métodos de microscopia óptica de superresolución se han ampliado para incluir imágenes tridimensionales, imágenes simultáneas de moléculas múltiples diferentes que utilizan sondas fluorescentes coloreadas de formas diferentes e imágenes de superresolución de células vivas. Además de las estructuras del citoesqueleto, la microscopia de superresolución ha revelado estructuras del núcleo finamente detalladas, la cromatina, sitios de unión de las células, y la membrana plasmática. Es probable que la investigación futura tenga como resultado el desarrollo de métodos con una resolución incluso superior a las actualmente disponibles, lo que permite la visualización de los eventos moleculares dentro de las células vivas.

◆ El Premio Nobel de Química fue concedido en 2014 a Eric Betzig, Stefan Hell y William Moerner por el desarrollo de la microscopia de superresolución óptica.

VÍDEO 1.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v1.2

Microscopia óptica de superresolución. Las técnicas de microscopia de superresolución permiten capturar imágenes con una resolución mayor que el límite de difracción de la luz visible.

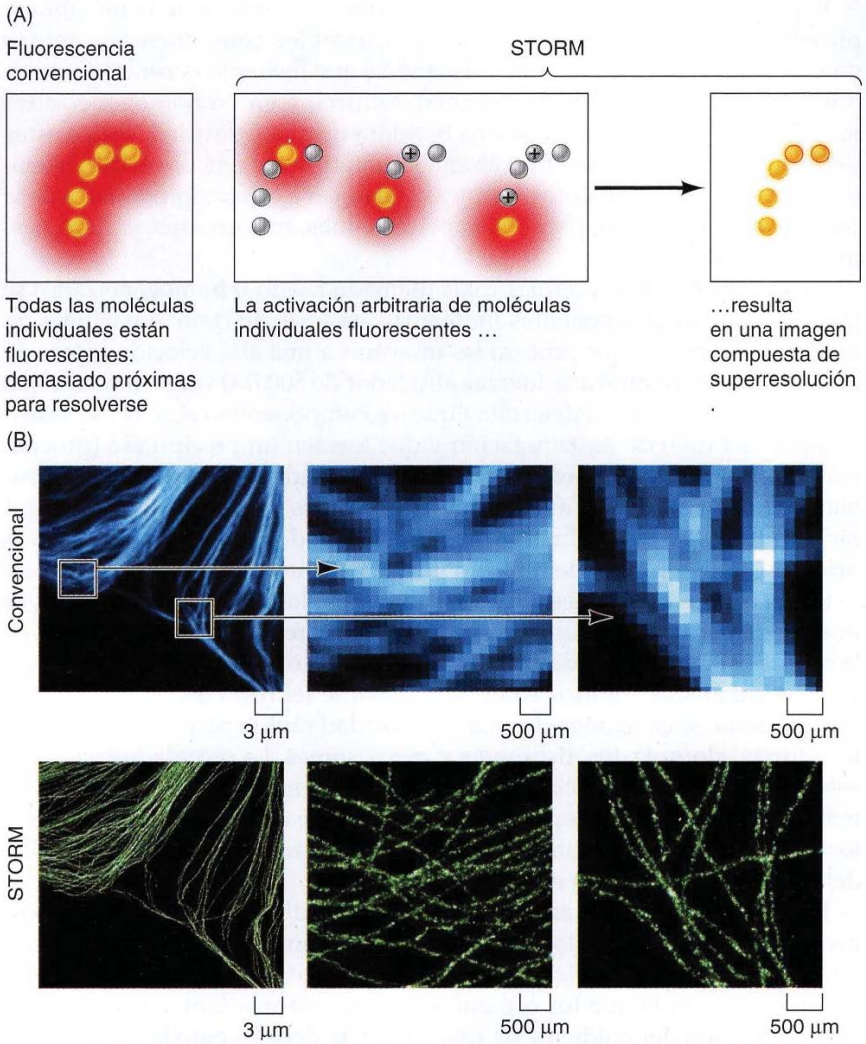


FIGURA 1.39 Microscopia óptica de superresolución. (A) En la microscopia fluorescente convencional, todas las moléculas fluorescentes de una muestra experimentan el fenómeno de fluorescencia al mismo tiempo y producen una imagen borrosa. En STORM, sólo una fracción aleatoria reducida de las sondas es fluorescente en un momento dado. Con el tiempo se obtienen múltiples imágenes, de manera que es posible resolver moléculas fluorescentes individuales y se construye una imagen compuesta de superresolución. (B) Comparación entre microscopia convencional y STORM de microtúbulos. (De M. Bates et al., 2007. *Science* 31: 1749; cortesía de B. Huang, Harvard University).

Separación subcelular

Aunque el microscopio electrónico ha permitido una observación detallada de la estructura celular, la microscopia en exclusiva no resulta suficiente para definir las funciones de los numerosos componentes de las células eucariotas. Para contestar muchas de las preguntas que atañen a la función de los orgánulos celulares, ha sido necesario aislar a los orgánulos de las células eucariotas de forma que puedan utilizarse para estudios bioquímicos. Normalmente, esto se realiza mediante la **centrifugación diferencial** —un método desarrollado por Albert Claude, Christian de Duve y sus colaboradores en los años 1940 y 1950 para separar los componentes de las células de acuerdo con sus tamaños y densidades.

El primer paso en la separación subcelular es la rotura de la membrana plasmática bajo condiciones que no destruyan los componentes internos de la célula. Se utilizan diferentes métodos, que incluyen la sonicación (exposición a sonidos de alta frecuencia), reducción en un homogeneizador mecánico, o el tratamiento con una batidora de alta velocidad. Todos estos procedimientos rompen la membrana plasmática y el retículo endoplasmático en pequeños fragmentos mientras que dejan a otros componentes de la célula (como el núcleo, lisosomas, peroxisomas, mitocondria y cloroplastos) intactos.

La suspensión de las células rotas (llamado lisado u homogeneizado) se fracciona en sus componentes mediante una serie de centrifugaciones en una **ultracentrífuga** que procesa las muestras a una alta velocidad (más de 100.000 rpm) para producir fuerzas alrededor de 500.000 veces mayores que la gravedad. Esta fuerza determina que los componentes celulares se sitúen al fondo del tubo de centrifugación y que formen un precipitado (proceso llamado sedimentación) en un grado que depende del tamaño y la densidad, sedimentándose las estructuras más grandes y pesadas con mayor rapidez (**Fig. 1.40**). Normalmente el homogeneizado celular se centrifuga la primera vez a velocidad lenta, que sedimenta solamente las células que no se han roto y las grandes estructuras celulares —los núcleos—. Por tanto, se puede obtener una fracción rica en núcleos del precipitado que se forma en la centrifugación a velocidad lenta, mientras que otros componentes celulares continúan suspendidos en el sobrenadante (el resto de la solución). El sobrenadante se centrifuga después a velocidad rápida para sedimentar mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y peroxisomas. La recentrifugación del sobrenadante a gran velocidad sedimenta fragmentos de la membrana plasmática y del retículo endoplasmático. Una cuarta centrifugación a gran velocidad sedimenta ribosomas, dejando exclusivamente la porción soluble del citoplasma (el citosol) en el sobrenadante.

ANIMACIÓN 1.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a1.1

Separación subcelular. Una vez rotas las células por sonicación, sus constituyentes subcelulares son fraccionados mediante diferentes tipos de centrifugación.

Las fracciones obtenidas de la centrifugación diferencial corresponden a preparaciones de orgánulos enriquecidas, pero no puras. Se puede obtener un mayor nivel de purificación mediante la **centrifugación en gradiente de densidad**, en la que los orgánulos se separan mediante la sedimentación en función del gradiente de una sustancia densa, como la sacarosa. En la **centrifugación por velocidad**, el material primario se estratifica en el gradiente de sacarosa (**Fig. 1.41**). Partículas de diferentes tamaños se sedimentan por el gradiente en diferentes escalas, moviéndose como bandas discretas. Después de la centrifugación, la colección de fracciones individuales del gradiente proporciona la información necesaria para separar a los orgánulos de tamaños similares, como mitocondrias, lisosomas y peroxisomas.

La **centrifugación de equilibrio** en gradiente de densidad puede utilizarse para separar componentes subcelulares en función de su migración en un gradiente de densidad, independientemente de su tamaño y forma. En este procedimiento, la muestra se centrifuga en un gradiente que contiene una alta concentración de sacarosa o cloruro de cesio. En lugar de separarse de acuerdo con su velocidad de sedimentación, las partículas de la muestra se centrifugan hasta que han alcanzado una posición de equilibrio en la que su densidad es igual a la de la solución de sacarosa o cloruro de cesio. Estas centrifugaciones de equilibrio resultan útiles a la hora de separar diferentes tipos de membranas y son lo suficientemente sensibles para separar macromoléculas marcadas con diferentes isótopos. Un ejemplo clásico, discutido en el Capítulo 4, es el análisis de la replicación del ADN mediante la separación de las moléculas de ADN que contienen isótopos pesados y ligeros de nitrógeno (^{15}N y ^{14}N) usando la centrifugación de equilibrio en gradientes de cloruro de cesio.

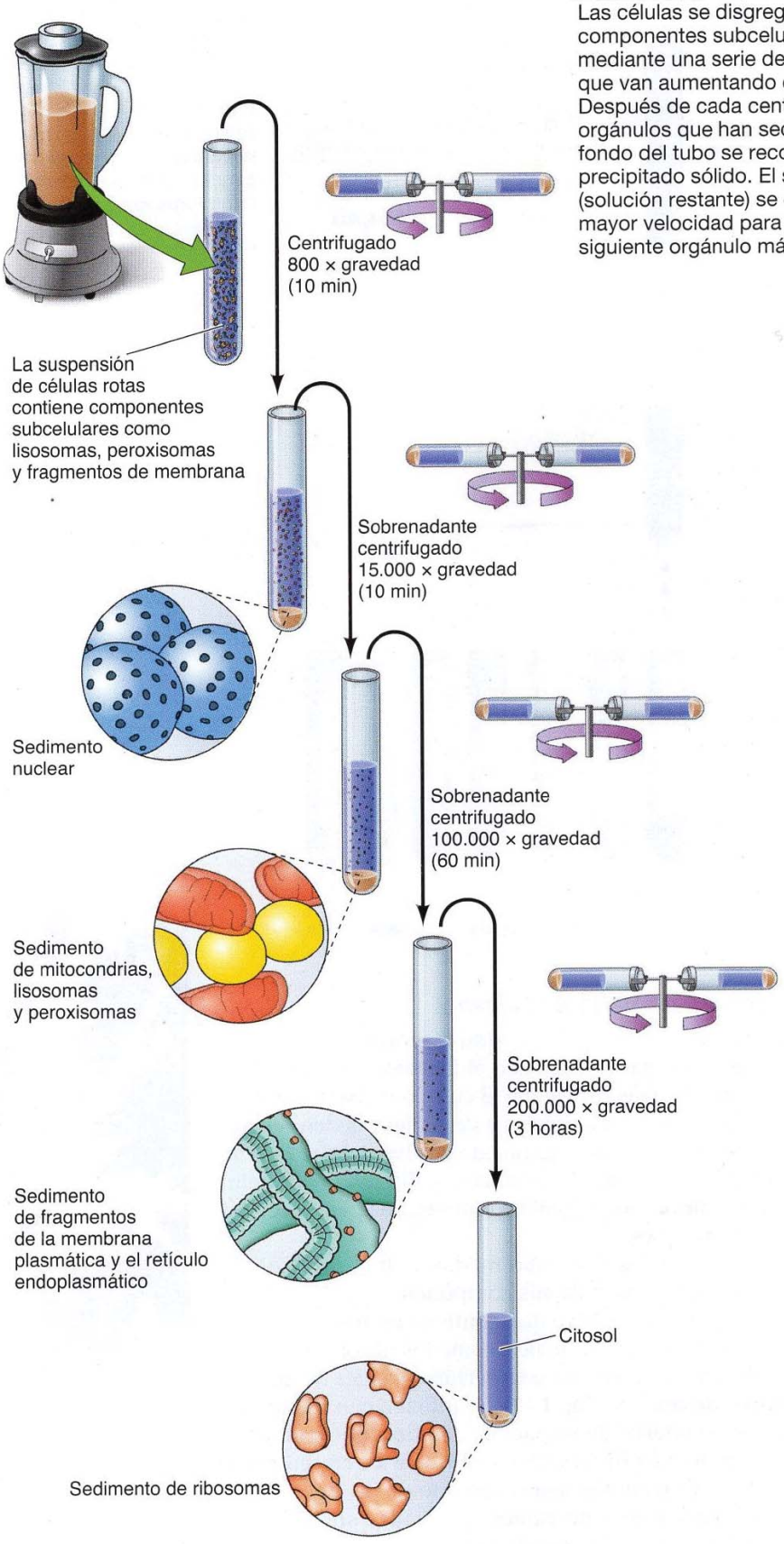


FIGURA 1.40 Separación subcelular. Las células se disgregan (lisan) y los componentes subcelulares se separan mediante una serie de centrifugaciones que van aumentando de velocidad. Después de cada centrifugación, los orgánulos que han sedimentado en el fondo del tubo se recogen en forma de precipitado sólido. El sobrenadante (solución restante) se centrifuga a una mayor velocidad para sedimentar el siguiente orgánulo más grande.

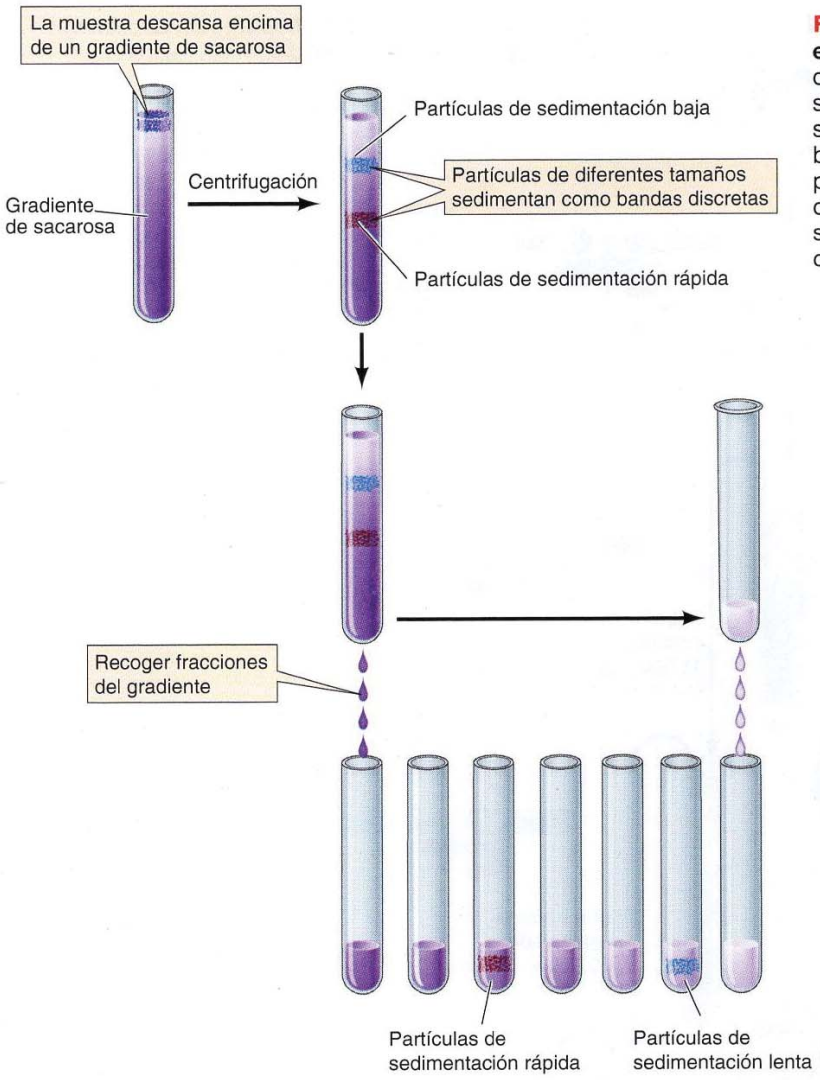


FIGURA 1.41 Velocidad de centrifugación en un gradiente de densidad. La muestra descansa encima de un gradiente de sacarosa, y partículas de diferentes tamaños sedimentan a través del gradiente en forma de bandas discretas. Las partículas separadas pueden recogerse en fracciones individuales del gradiente, que pueden obtenerse simplemente punzando el fondo del tubo de centrifugación y recogiendo las gotas.

Crecimiento de las células animales en cultivo

La habilidad para estudiar las células depende en su mayoría de la facilidad con la que pueden crecer y ser manipuladas en el laboratorio. Aunque el proceso es técnicamente mucho más difícil que el cultivo de bacterias o levaduras, una gran variedad de células animales y vegetales pueden ser cultivadas y manipuladas en cultivo. Los sistemas de cultivo celular *in vitro* han permitido a los científicos estudiar el crecimiento y diferenciación celular, así como desarrollar manipulaciones genéticas necesarias para entender la estructura y función de los genes.

Los cultivos de células animales se inician mediante la dispersión de una parte de tejido en una suspensión de sus componentes celulares, que se añade más tarde a una placa de cultivo que contiene un medio nutritivo. La mayoría de los tipos de células animales, como los fibroblastos y las células epiteliales, se adhieren y crecen en la superficie plástica de las placas usadas para el cultivo de células (**Fig. 1.42**). Se utilizan con frecuencia embriones y tumores como material de iniciación, debido a que contienen células de crecimiento rápido. Los fibroblastos embrionarios crecen particularmente bien en cultivo, y en consecuencia son uno de los tipos de células animales más estudiados. Bajo condiciones apropiadas, sin embargo, algunas células especializadas también pueden crecer en cultivo, permi-

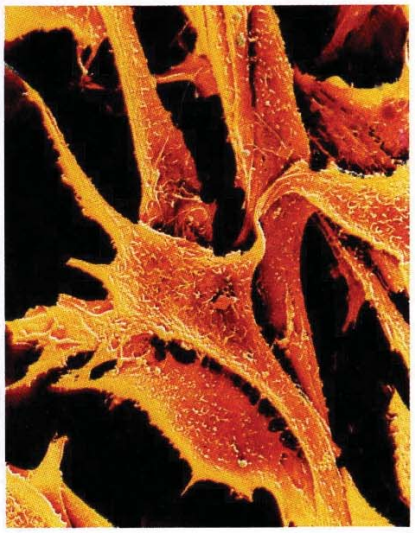
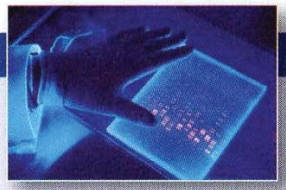


FIGURA 1.42 Células animales en cultivo. Micrografía electrónica de barrido de fibroblastos humanos unidos a la superficie del disco de cultivo (se ha añadido color artificial).



EXPERIMENTO CLAVE

Células HeLa

Estudios sobre la capacidad proliferativa del carcinoma cervical y el epitelio normal que emplean cultivos de tejido

George O. Gey, Ward D. Coffman and Mary T. Kubicek

Johns Hopkins Hospital and University, Baltimore, MD

Cancer Research, Volumen 12, 1952, págs. 264-265

George O. Gey

Contexto

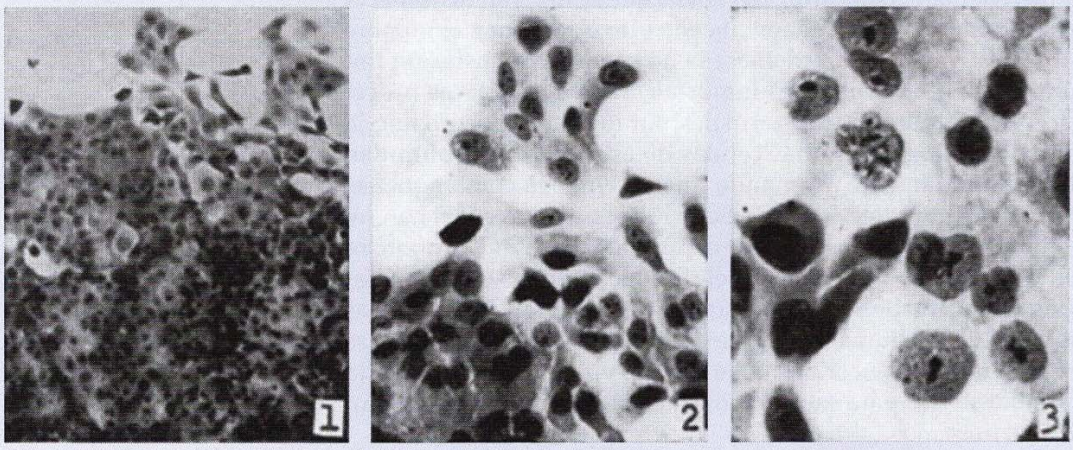
Los primeros cultivos celulares se basaban en el crecimiento celular a partir de fragmentos de tejido que estaban embebidos en coágulos de plasma, un sistema de cultivo que estaba lejos de ser adecuado para el análisis experimental. En los años 40, uno de los mayores avances fue establecer líneas celulares que crecían a partir de células aisladas adheridas a la superficie de las placas de cultivo. La primera de estas líneas celulares, llamada célula L, establecida en 1942, fue del ratón. Sin embargo, resultó mucho más difícil establecer líneas de células de origen humano, que fueron muy deseadas como modelo para la investigación del cáncer. A pesar de muchos intentos, los científicos fueron incapaces de hacer crecer células humanas en cultivo durante poco más de unas semanas. El avance se produjo en 1951, cuando George Gey y sus colegas establecieron la primera línea de células humanas, células HeLa, a partir de tejido de un cáncer de cuello de útero.

Experimentos

Las células HeLa se cultivaron a partir de la biopsia de un cáncer cervical realizada a una mujer de 30 años de edad, Henrietta Lacks, en febrero de 1951. Al igual que muchos especímenes de cáncer que Gey y sus colegas habían intentado establecer anteriormente en el cultivo, la muestra de tejido de Henrietta Lacks se colocó en medio. Ésta contenía plasma de pollo, extracto de embrión de ternera y sangre umbilical humana. Sin embargo, a diferencia de los muchos intentos anteriores, las células cancerígenas de Henrietta Lacks crecieron rápidamente y siguieron creciendo en cultivo, haciendo que las células HeLa se convirtieran en la primera línea celular humana de cáncer. La historia detrás de esta línea celular y gran parte de la historia del temprano cultivo celular se describen en *La vida inmortal de Henrietta Lacks* de Rebecca Skloot, 2010.

Impacto

Las células HeLa se han convertido en la línea celular más utilizada para la investigación del cáncer y otros estudios de biología celular humana. Uno de los primeros usos de células HeLa fue para el desarrollo de la vacuna contra la polio, ya que se encontró que el virus de la polio crecía fácilmente en estas células. En la actualidad continúan siendo utilizados como sistema modelo en prácticamente todos los aspectos de la biología molecular y celular humana, incluidos los estudios de replicación del ADN, la expresión génica, la división celular, virología, cáncer y señalización celular. Como indicador de su importancia se destaca que las células HeLa se han utilizado en más de 70.000 artículos de investigación publicados. Por otra parte, muchas otras líneas celulares humanas ya se han establecido y estas líneas forman la base para los estudios contemporáneos de la biología celular humana.



Microfotografías de células HeLa con ampliaciones de 65, 160, y 250×.
(De Scherer, W. F., J. T. Syverton y G. O. Gey. 1953. *J. Exp. Med.* 97: 695–710.)

tiendo así el estudio de sus propiedades en un ambiente experimental controlado. Las **células madre embrionarias (ES)** constituyen un ejemplo especialmente notable. Estas células se establecen en cultivo a partir de embriones tempranos y mantienen su capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares presentes en los organismos adultos. En consecuencia, las células madre embrionarias han representado un papel importante en el estudio de las funciones de una variedad de genes del desarrollo murino, además de ofrecer la posibilidad de contribuir al tratamiento de enfermedades humanas, al constituir una fuente de tejido para las terapias de trasplante.

El medio de cultivo necesario para la propagación de células animales es mucho más complejo que el medio mínimo para sustentar el crecimiento de las bacterias y levaduras. Además de sales y glucosa, el medio utilizado para los cultivos de células animales contiene varios aminoácidos y vitaminas, que las células no pueden producir por sí mismas. El medio de crecimiento de muchas células animales en cultivo también incluye suero, que sirve como fuente de factores de crecimiento polipeptídicos que son necesarios para estimular la división celular. Se han identificado varios factores de crecimiento. Actúan como reguladores críticos del crecimiento y la diferenciación celular en organismos multicelulares, proporcionando señales mediante las que diferentes células se comunican unas con otras. Por ejemplo, una función importante de los fibroblastos de la piel en el animal intacto es la proliferación cuando se necesita reparar el daño causado por un corte o una herida. Su división está desencadenada por un factor de crecimiento liberado por las plaquetas durante la coagulación, derivando la estimulación de la proliferación de los fibroblastos del entorno del tejido dañado. La identificación de los factores de crecimiento individuales ha hecho posible el cultivo de una variedad de células en un medio libre de suero (medio en el que el suero ha sido reemplazado por factores de crecimiento específicos necesarios para la proliferación de las células en cuestión).

Los cultivos iniciales de células establecidos a partir de un tejido se denominan **cultivos primarios** (**Fig. 1.43**). Las células en un cultivo primario normalmente crecen hasta cubrir la superficie de la placa de cultivo. Después pueden ser retiradas de la placa y reponerse a baja densidad para formar cultivos secundarios. Este proceso se puede repetir muchas veces, aunque la mayoría de las células normales no pueden crecer en cultivo indefinidamente. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales admiten desde 50 a 100 duplicaciones de la población, después de las cuales paran de crecer y mueren. Por el contrario, las células que se derivan de tumores con frecuencia proliferan indefinidamente en cultivo y reciben el nombre de **líneas celulares inmortales**. Además, se ha conseguido aislar un importante número de líneas celulares inmortalizadas de roedores procedentes de cultivos de fibroblastos normales. En lugar de morir como la mayoría de sus homólogos, algunas células de estos cultivos continúan proliferando indefinidamente, formando líneas celulares como aquellas que se derivan de los tumores. Tales líneas celulares permanentes han resultado muy útiles para muchos tipos de experimentos ya que proporcionan una fuente continua y uniforme de células que pueden ser manipuladas, clonadas y cultivadas indefinidamente en el laboratorio. Las primeras líneas celulares humanas que se establecieron fueron las células HeLa, que se aislaron del cáncer de cuello uterino en 1951 y se han usado en cientos de laboratorios para estudiar los múltiples aspectos de la biología celular de los humanos.

Incluso bajo condiciones óptimas, el tiempo de división de la mayoría de las células animales que crecen activamente es del orden de 20 horas —diez

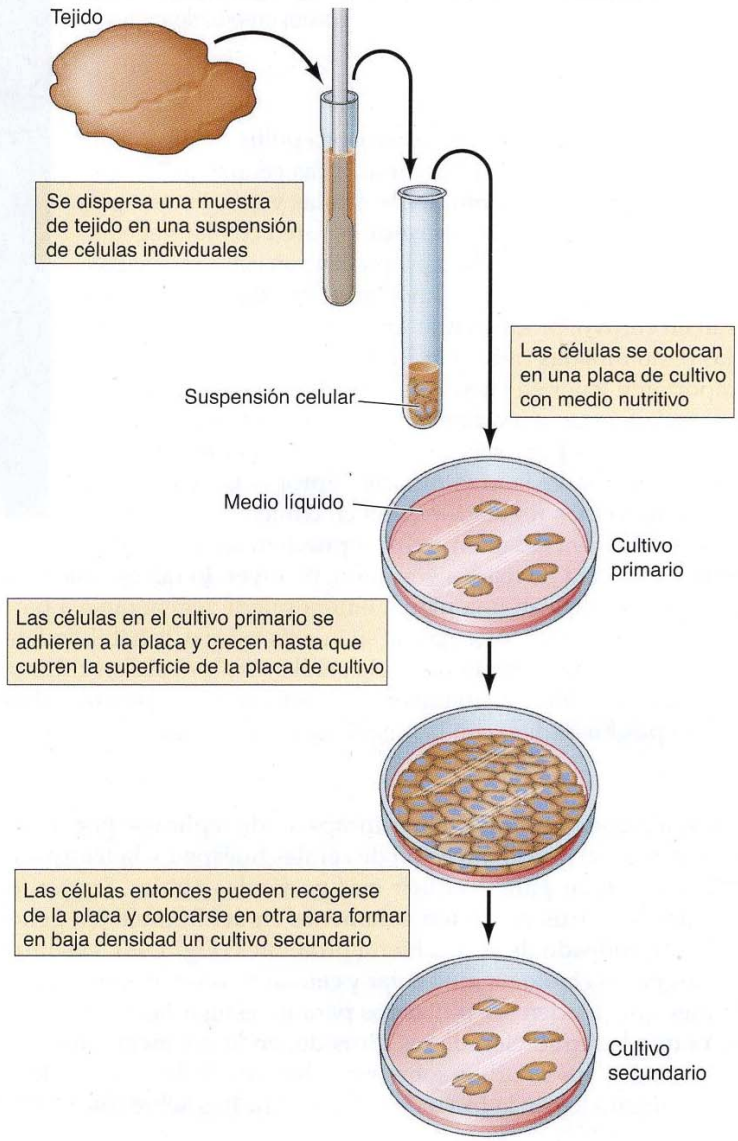


FIGURA 1.43 Cultivo de células animales. Las células procedentes de un tejido se cultivan en medio nutritivo en placas Petri. El primer cultivo obtenido se denomina cultivo primario.

veces más largo que el tiempo de división de las levaduras—. Por tanto, los experimentos con células animales cultivadas son mucho más difíciles y más largos que aquellos con bacterias y levaduras. Por ejemplo, el crecimiento de una colonia visible de células animales a partir de una sola célula dura una semana o más, mientras que las colonias de *E. coli* o de levaduras se desarrollan durante una noche. No obstante, las manipulaciones genéticas de las células animales en cultivo resultan indispensables para el entendimiento de la estructura y función de la célula.

Cultivo de células vegetales

Las células vegetales también pueden ser cultivadas en un medio nutritivo que contenga las moléculas apropiadas para la regulación del crecimiento.

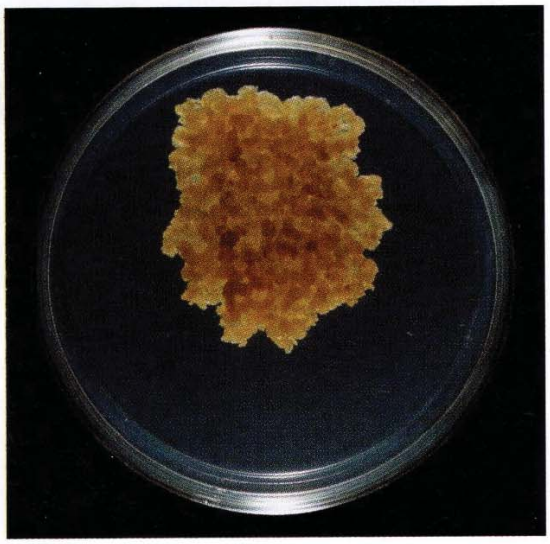


FIGURA 1.44 Células vegetales en cultivo. Una masa indiferenciada de células de maíz negro dulce mexicano (un callo) creciendo en un medio sólido.

Al contrario que los factores de crecimiento polipeptídicos que regulan la proliferación de la mayoría de las células animales, los reguladores del crecimiento de las células vegetales son pequeñas moléculas capaces de atravesar la pared celular vegetal. Cuando se suministran mezclas apropiadas con estas moléculas reguladoras del crecimiento, muchos tipos de células vegetales proliferan en cultivo, produciendo una masa de células no diferenciadas denominadas **callo** (**Fig. 1.44**).

Es importante tener en cuenta que muchas células vegetales son capaces de formar cualquiera de los distintos tipos celulares y tejidos necesarios para regenerar una planta completa. En consecuencia, mediante la manipulación apropiada de nutrientes y de las moléculas reguladoras del crecimiento, las células vegetales no diferenciadas en cultivo pueden ser inducidas para formar variedad de tejidos vegetales, incluyendo raíces, tallos y hojas. En muchos casos, incluso una planta entera puede regenerarse a partir de una sola célula en cultivo. Además de su interés teórico, la habilidad de producir una nueva planta desde una sola célula manipulada en cultivo hace posible la introducción de alteraciones genéticas en las plantas, abriendo importantes posibilidades para la ingeniería genética agrícola.

Virus

Los virus son parásitos intracelulares incapaces de replicarse por sí mismos. Se reproducen mediante la infección de células huésped y la usurpación de la maquinaria celular para producir más partículas virales. En sus formas más simples, los virus consisten solamente en ácido nucleico genómico (ADN o ARN) rodeado de una cubierta proteínica (**Fig. 1.45**). Los virus son importantes para la biología molecular y celular porque proporcionan sistemas simples que pueden ser utilizados para investigar las funciones de las células. Ya que la replicación de los virus depende del metabolismo de las células infectadas, los estudios sobre virus han revelado muchos de los aspectos fundamentales de la biología celular. Estudios sobre los virus bacte-

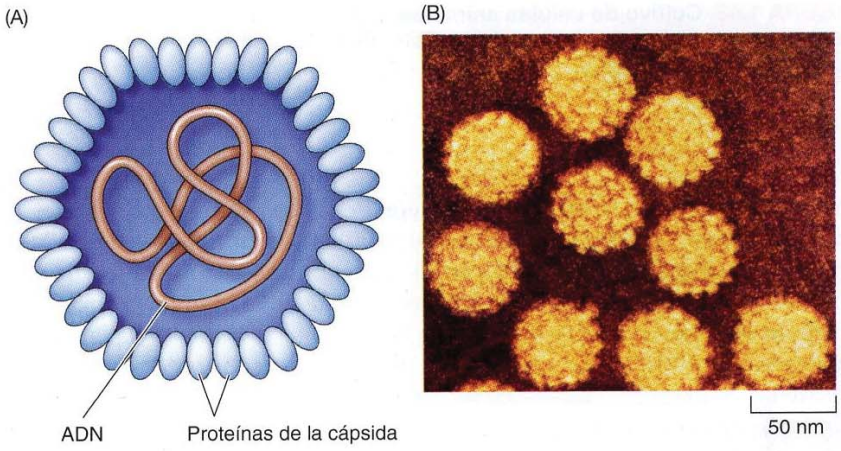
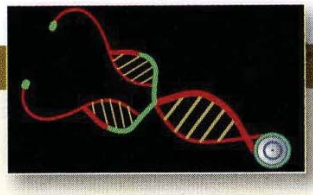


FIGURA 1.45 Estructura de un virus animal. (A) Partículas del papilomavirus que contienen una pequeña molécula de ADN circular encapsulada en una cubierta de proteínas (la cápsida). (B) Micrografía electrónica de partículas del virus del papiloma humano. Se han añadido colores artificiales.



MEDICINA MOLECULAR

Virus y cáncer

Enfermedad

El cáncer incluye un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular incontrolada. El crecimiento de las células animales normales está cuidadosamente regulado para mantener las necesidades del organismo al completo. Por el contrario, las células cancerígenas crecen de manera descontrolada, invadiendo e interfiriendo en la función de tejidos y órganos normales. El cáncer es la segunda causa más común de muerte (después de las enfermedades cardíacas) en Estados Unidos. Aproximadamente uno de cada tres americanos desarrollará cáncer en algún momento de su vida y, en espera de mejores avances en su tratamiento, cerca de uno de cada cuatro americanos morirá de esta enfermedad. Entender las causas del cáncer y el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento resultan por tanto los principales objetivos de la investigación médica.

Bases moleculares y celulares

Actualmente sabemos que el cáncer es el resultado de mutaciones en los genes que normalmente controlan la proliferación celular. Los descubrimientos fundamentales que han conducido a la identificación de estos genes han surgido de los estudios de virus que causan cáncer en animales, el prototipo de los cuales fue aislado por Peyton Rous en 1911. Rous descubrió que los sarcomas (un cáncer del tejido conectivo) en pollos podían transmitirse mediante un virus, o RSV (siglas en inglés del Virus del Sarcoma de Rous). Debido a que RSV es un retrovirus con un genoma de tan solo 10.000 pares de bases, éste podía someterse a análisis moleculares mucho más fácilmente que los complejos genomas de los pollos u otras células animales. Estos estudios condujeron a la identificación de un gen específico causante del cáncer (oncogén) transportado por el virus, y al descubrimiento de genes relacionados en las células normales de todas las especies de vertebrados, incluyendo a los humanos. Algunos cánceres en los humanos se sabe que están causados por virus; otros resultan de las mutaciones en los genes de las células normales de forma similar al primer oncogén identificado en el RSV.

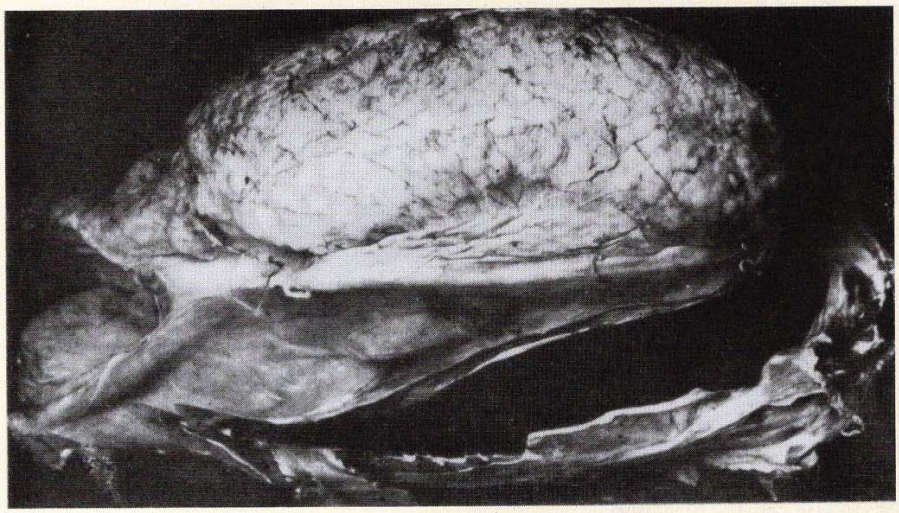
Prevención y tratamiento

Los cánceres humanos que están causados por virus incluyen el cervical y otros cánceres anogenitales (virus del papiloma), cáncer de hígado (virus de la hepatitis B y C), y algunos tipos de linfomas (virus Epstein-Barr y el virus humano linfotrópico de las células T). Juntos, estos cánceres inducidos por virus representan alrededor del 20% de la incidencia de cáncer en el mundo. En principio, estos cánceres se podrían prevenir con vacunas en contra del virus responsable, consiguiéndose un progreso considerable en este área el desarrollo de una vacuna efectiva contra el virus de la hepatitis B y papilomavirus humanos.

Otros cánceres humanos están causados por la mutación de genes en células normales, muchas de las cuales ocurren durante la vida del individuo en lugar de heredarse. Los estudios sobre los virus causantes de cánceres han proporcionado la identificación de muchos genes responsables de los cánceres no inducidos por virus, y el entendimiento de los mecanismos moleculares responsables del desarrollo del cáncer. Se están haciendo verdaderos esfuerzos para utilizar la biología molecular y celular del cáncer para desarrollar nuevos avances en su tratamiento. De hecho, la primera droga de diseño eficaz en el tratamiento del cáncer humano (la droga del fármaco imatinib o Gleevec, descrito en el Cap. 19) fue desarrollada contra un gen muy similar al oncogén RSV.

Referencia

Rous, P. 1911. Un sarcoma del ave de corral transmisible por un agente separable de las células tumorales. *J. Exp. Med.* 13: 397-411.



El tumor trasplantado del que fue aislado el virus del sarcoma de Rous.

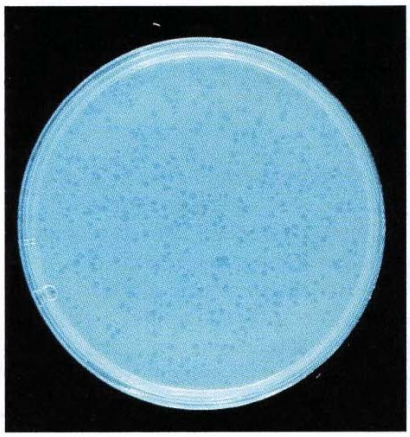


FIGURA 1.46 Placas de bacteriófagos. Las placas de T4 son visibles en un tapiz de *E. coli*. Cada placa se forma por la replicación de una sola partícula del virus.

TABLA 1.3 Ejemplos de virus animales

Familia de virus	Miembro representativo	Tamaño del genoma (miles de pares de bases)
Genomas ARN		
Picornavirus	Poliovirus	7-8
Togavirus	Virus de la rubeola	12
Flavivirus	Virus de la fiebre amarilla	10
Paramixovirus	Virus del sarampión	16-20
Ortomixovirus	Virus de la gripe	14
Retrovirus	Virus de la inmunodeficiencia humana	9
Genomas ADN		
Hepadnavirus	Virus de la hepatitis B	3,2
Papovavirus	Papilomavirus humano	5-8
Adenovirus	Adenovirus	36
Herpesvirus	Virus del herpes simple	120-200
Poxvirus	Virus Vaccinia	130-280

rianos contribuyeron sustancialmente a la comprensión de los mecanismos básicos de la genética molecular, y fueron los experimentos con virus vegetales (con el virus del mosaico del tabaco) los que demostraron por primera vez el potencial genético del ARN. Los virus animales han proporcionado pruebas sensibles para las investigaciones de varias actividades de las células eucariotas.

El rápido crecimiento y el pequeño tamaño de las bacterias hacen de ellas un elemento excelente para los experimentos en biología molecular, y los virus bacterianos (**bacteriófagos**) han simplificado el estudio de la genética bacteriana. Uno de los bacteriófagos más importantes es T4, que infecta y se replica en *E. coli*. La infección con una sola partícula de T4 conduce a la formación de una progenie de aproximadamente 200 partículas virales en 20-30 minutos. La célula infectada inicialmente después estalla (se lisa), liberando las partículas virales al medio, donde pueden infectar a nuevas células. En un cultivo de bacterias creciendo en un medio con agar, la replicación de T4 conduce a la formación de una zona clara de células lisadas (una placa) en una plancha o «césped» de bacterias (**Fig. 1.46**). Si las partículas virales infecciosas son fáciles de reproducir y de manipular, los mutantes virales —p. ej., virus que crecerán en una cepa de *E. coli* pero no en otra— son fáciles de aislar. Por tanto, T4 se manipula con mayor frecuencia que *E. coli* en estudios de genética molecular. Además, el genoma de T4 es 23 veces menor que el de *E. coli* —aproximadamente 0,2 millones de pares de bases— lo cual facilita el análisis genético. Otros bacteriófagos tienen incluso genomas más pequeños —el más simple consiste en moléculas de ARN de tan solo 3.600 nucleótidos—. Los virus bacterianos han proporcionado, por tanto, unos sistemas de experimentación extremadamente útiles para la genética molecular. Muchos principios fundamentales de la biología molecular se basan en estudios con estos virus.

Debido al aumento de la complejidad del genoma de las células animales, los virus han sido aún más importantes en los estudios de las células animales que en los estudios de las bacterias. Muchos virus animales se replican y se estudian mediante la formación de placas en los cultivos celulares, mucho más que los bacteriófagos. Además, los genomas de los virus animales son similares en complejidad a los virus bacterianos (variando aproximadamente desde 3.000 a 300.000 pares de bases), de tal forma que los virus animales son mucho más manejables que los de sus células huésped.

◆ Los virus animales a menudo son utilizados en terapia génica como transportador de genes para introducirlos en las células (véase Cap. 4).

Existen diversidad de virus animales, cada uno de ellos presentando ADN o ARN como material genético (**Tabla 1.3**). Una familia de virus animales —los **retrovirus**— contienen genomas de ARN en sus partículas virales pero sintetizan una copia de ADN de su genoma en las células infectadas. Estos virus proporcionan un buen ejemplo de la importancia de los virus como modelos, ya que los estudios de los retrovirus fueron los que demostraron la síntesis del ADN a partir de los moldes de ARN —una manera fundamental de transferencia de información genética ahora conocida en células procariotas y eucariotas—. Otros ejemplos en los que los virus animales han proporcionado modelos importantes para la investigación de sus células huésped incluyen estudios de la replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN y transporte y secreción de proteínas.

Cabe destacar que la infección por algunos virus animales, en lugar de matar a la célula huésped, convierten a una célula normal en una célula cancerosa. Los estudios sobre estos virus causantes de cánceres, descritos por primera vez por Peyton Rous en 1911, no solo han proporcionado las bases de nuestro actual conocimiento del cáncer a nivel molecular y celular, sino que también han conducido al descubrimiento de muchos mecanismos moleculares que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células animales.

RESUMEN

Origen y evolución de las células

La primera célula: Todas las células existentes en la actualidad, procariotas y eucariotas, descienden de un único antepasado. Se cree que la primera célula apareció al menos hace 3.800 millones de años como resultado del recubrimiento del ARN, capaz de autorreplicarse, en una membrana de fosfolípidos.

célula procariota, célula eucariota, mundo del ARN, gen, transcripción, traducción, fosfolípidos, anfipáticos, hidrofóbico, hidrofílico

Evolución del metabolismo: Las primeras reacciones para la creación de energía metabólica fueron en forma de glicólisis anaerobia. Después evolucionó la fotosíntesis, seguida del metabolismo oxidativo.

adenosina 5'-trifosfato (ATP), glicólisis, fotosíntesis, metabolismo oxidativo

Actuales procariotas: Los actuales procariotas se encuentran divididos en dos grupos, las arquebacterias y las bacterias, que divergen al principio de la evolución.

arqueobacterias, bacterias, cianobacterias, *Escherichia coli* (*E. coli*), pared celular, membrana plasmática, ribosoma

Células eucariotas: Las células eucariotas, que son más grandes y complejas que las células procariotas, contienen un núcleo y orgánulos citoplasmáticos.

núcleo, mitocondria, cloroplasto, lisosoma, peroxisoma, vacuola, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, citoesqueleto, endosimbiosis

El origen de células eucariotas: Se cree que las células eucariotas se han desarrollado a partir de asociaciones simbióticas de procariotas. El genoma de eucariotas puede haber surgido a partir de la fusión de genomas bacterianos y arqueobacterianos.

endosimbiosis

Desarrollo de los organismos multicelulares: Los eucariotas más simples son organismos unicelulares, como las levaduras y las amebas. Los organismos multicelulares evolucionaron por la asociación entre los eucariotas unicelulares, y la reproducción por división condujo al desarrollo de muchas clases de células especializadas que forman las plantas y animales del presente.

levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, célula epitelial, fibroblasto, eritrocito, granulocito, monocito, macrófago, linfocito, neurona

Ver Vídeo 1.1

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Células como modelos experimentales

E. coli: Debido a su simplicidad genética y su fácil estudio, las bacterias como *E. coli* resultan particularmente útiles para la investigación de los aspectos fundamentales de la bioquímica y biología molecular.

Levaduras: Por ser las células eucariotas más simples, las levaduras son un modelo importante para el estudio de diversos aspectos de la biología celular eucariota.

Caenorhabditis elegans: El nematodo *C. elegans* es un organismo multicelular simple que sirve como modelo importante para la biología del desarrollo.

Caenorhabditis elegans

Drosophila melanogaster: Debido al análisis genético tan extenso, los estudios de la mosca de la fruta *Drosophila* han conducido a avances superiores en el entendimiento del desarrollo animal.

Drosophila melanogaster

Arabidopsis thaliana: La pequeña planta de flor *Arabidopsis* se utiliza como modelo para los estudios de la biología molecular de las plantas y su desarrollo.

Arabidopsis thaliana

Vertebrados: Muchos tipos de células de los vertebrados pueden crecer en cultivo, donde pueden ser estudiadas bajo condiciones de laboratorio controladas. Los tipos de células especializadas, como las neuronas y las células musculares, proporcionan modelos útiles para la investigación de determinados aspectos de la biología celular. La rana *Xenopus laevis* y el pez cebra son importantes modelos para el estudio del desarrollo de los primeros vertebrados, y el ratón es la especie de mamífero adecuada para el análisis genético.

***Xenopus laevis*, pez cebra**

Instrumentos de la biología celular

Microscopia óptica: Se aplican diversos métodos para visualizar las células y las estructuras subcelulares y para determinar la localización intracelular de moléculas específicas usando el microscopio óptico.

resolución, microscopia de campo luminoso, microscopia de fase-contraste, microscopia interferencia-contraste diferencial, microscopia fluorescente, proteína fluorescente verde (GFP), recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueamiento (FRAP), transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) microscopia confocal, microscopia por excitación de dos fotones

Microscopia electrónica: La microscopia electrónica, con una resolución aproximada cien veces mayor que la del microscopio óptico, se utiliza para analizar los detalles de la estructura celular.

microscopia de transmisión de electrones, tomografía electrónica, sombreado de metal, separación por congelación, aguafuerte congelado, microscopia electrónica de barrido

Microscopia óptica de superresolución: Diferentes métodos de superresolución de microscopia fluorescente rompen la barrera de difracción y aumentan la resolución de microscopia óptica a 10-100 nm.
Ver Vídeo 1.2

microscopia de superresolución

Separación subcelular: Los orgánulos de las células eucariotas se pueden aislar para su análisis bioquímico mediante la centrifugación diferencial.
Ver Animación 1.1

centrifugación diferencial, ultracentrifugación, centrifugación en gradiente-densidad, centrifugación por velocidad, centrifugación de equilibrio

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Crecimiento de células animales en cultivo: La propagación de las células animales en cultivo ha permitido el estudio de los mecanismos que controlan el crecimiento y la diferenciación.

Cultivo de células vegetales: Los cultivos de células vegetales se pueden diferenciar para formar tipos de células especializadas; en algunos casos, pueden regenerar plantas enteras.

Virus: Los virus proporcionan modelos simples para el estudio de la función celular.

PALABRAS CLAVE

célula madre embrionaria, cultivo primario, línea celular

callo

bacteriólogo, retrovirus

Preguntas

1. ¿Qué demostraron los experimentos de Stanley Miller sobre la formación de moléculas orgánicas?
2. ¿Qué tipo de macromolécula es capaz de dirigir su propia autorreplicación?
3. Discute las evidencias que apuntan que las mitocondrias y los cloroplastos se originaron a partir de bacterias que fueron internalizadas por el precursor de las células eucariotas.
4. ¿Por qué se cree que la fotosíntesis ha favorecido la evolución del metabolismo oxidativo?
5. Dado que el diámetro de una célula bacteriana de *S. aureus* es de 1 µm y el diámetro de un macrófago humano es de 50 µm, ¿cuántas células de *S. aureus* caben en el interior de un solo macrófago humano? Asume que las células son esféricas.
6. ¿Qué organismo modelo proporciona el sistema más sencillo para el estudio de la replicación del ADN eucariótico?
7. Estás estudiando un gen implicado en el desarrollo embrionario mamario. ¿Qué organismo modelo sería el más apropiado para tus estudios?
8. ¿Qué resolución se puede obtener con un microscopio óptico si la muestra se observa al aire en lugar de a través de aceite? Asume que la longitud de onda de la luz visible es 0,5 µm.
9. Estás a punto de comprar un microscopio de investigación para tu laboratorio, y puedes elegir entre dos lentes objetivas diferentes. Una posee un aumento de ×100 y una apertura numérica de 1.1. La otra posee un aumento de ×60 y una apertura numérica de 1.3. Suponiendo que el precio no es un problema, ¿cuál de estos objetivos elegirías?
10. ¿Qué ventaja posee el uso de la proteína verde fluorescente (GFP) sobre el empleo de anticuerpos marcados con sondas fluorescentes para el estudio de la localización y movimiento de una proteína en el interior celular?
11. Identifica las diferentes características o propiedades de los orgánulos que permiten la separación por centrifugación de velocidad, en comparación con una centrifugación de equilibrio en un gradiente de sucrosa.
12. ¿Por qué generalmente es necesario el suero en el medio empleado para el cultivo de células animales?
13. Diferenciar entre cultivos de células primarias y líneas celulares inmortalizadas.
14. ¿Por qué es importante la capacidad de cultivar células madre embrionarias?

Bibliografía

Origen y evolución de las células

Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Eriksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133–140. [P]

Cech, T. R. 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4360–4363. [P]

Darnell, J. E. and W. F. Doolittle. 1986. Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1271–1275. [P]

De Duve, C. 2007. The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev. Genet.* 8: 395–403. [R]

Dyall, S. D., M. T. Brown and P. J. Johnson. 2004. Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* 304: 253–257. [R]

Joyce, G. F. 2007. A glimpse of biology's first enzyme. *Science* 315: 1507–1508. [R]

Kasting, J. F. and J. L. Siefert. 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296: 1066–1068. [R]

Lincoln, T. A. and G. F. Joyce. 2009. Self-sustained replication of an RNA enzyme. *Science* 323:1229–1232. [P]

Margulis, L. 1992. *Symbiosis in Cell Evolution.* 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Martin, W. and T. M. Embley. 2004. Early evolution comes full circle. *Nature* 431: 134–137. [R]

Mast, F. D., L. D. Barlow, R. A. Rachubinski and J. B. Dacks. 2014. Evolutionary mechanisms for establishing eukaryotic cellular complexity. *Trends Cell Biol.* 24: 435–442. [R]

Miller, S. L. 1953. A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. *Science* 117: 528–529. [P]

Prochnik, S. E. and 27 others. 2010. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri. Science* 329: 223–226. [P]

Rivera, M. C. and J. A. Lake. 2004. The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature* 431: 152–155. [P]

Szostak, J. W., D. P. Bartel and P. L. Luisi. 2001. Synthesizing life. *Nature* 409: 387–390. [R]

Velasco, R. and 85 others. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.) *Nature Genet.* 42: 833–841. [P]

Williams, T. A., P. G. Foster, C. J. Cox and T. M. Embley. 2013. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* 504: 231–236. [R]

Wochner, A., J. Attwater, A. Coulson and P. Holliger. 2011. Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme. *Science* 332: 209–212. [P]

Células como modelos experimentales

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster. Science* 287: 2185–2195. [P]

Blattner, F. R. and 16 others. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K–12. *Science* 277: 1453–1462. [P]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546–567. [P]

Hellsten, U. and 47 others. 2010. The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis. Science* 328: 633–636. [P]

Howe, K. and 171 others. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945. [P]

Lieschke, G. J. and P. D. Currie. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Rev. Genet.* 8: 353–367. [R]

Meyerowitz, E. M. 2002. Plants compared to animals: The broadest comparative study of development. *Science* 295: 1482–1485. [R]

Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562. [P]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana. Nature* 408: 796–815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018. [P]

Instrumentos de la biología celular

Bowers, W. E. 1998. Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol.* 8: 330–333 [R]

Cairns, J., G. S. Stent and J. D. Watson (eds.). 2007. *Phage and the Origins of Molecular Biology, The Centennial Edition.* Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chalfie, M. 2009. GFP: lighting up life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 10073–10080. [R]

Claude, A. 1975. The coming of age of the cell. *Science* 189: 433–435. [R]

De Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189: 186–194. [R]

Flint, S. J., L. W. Enquist, V. R. Racaniello and A. M. Skalka. 2009. *Principles of Virology.* 3rd ed. Washington, DC: ASM Press.

Giepmans, B. N. G., S. R. Adams, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217–224. [R]

Hosking, C. R. and J. Lippincott-Schwartz. 2009. The future's bright: imaging cell biology in the 21st century. *Trends Cell Biol.* 19: 553–554. [R]

Huang, B., H. Babcock and X. Zhuang. 2010. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* 143: 1047–1058. [R]

Koster, A. J. and J. Klumperman. 2003. Electron microscopy in cell biology: Integrating structure and function. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* 4: SS6–SS10. [R]

Lippincott-Schwartz, J., N. Altan-Bonnet and G. H. Patterson. 2003. Photobleaching and photoactivation: Following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biol.* 5: S7–S14. [R]

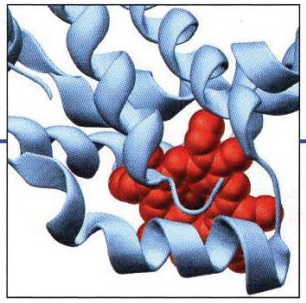
Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347–358. [R]

Porter, K. R., A. Claude and E. F. Fullam. 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 81: 233–246. [P]

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13: 397–411. [P]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154–158. [R]

Skloot, R. 2010. *The Immortal Life of Henrietta Lacks.* Penguin/Random House.



Capítulo 2

Moléculas y membranas

Moléculas de las células 47

Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos 62

Membranas 70

EXPERIMENTO CLAVE:
Plegamiento de las cadenas polipeptídicas 58

EXPERIMENTO CLAVE:
Estructura de las membranas celulares 74

Las células son estructuras increíblemente complejas y variadas, capaces no sólo de autorreplicarse —la propia esencia de la vida— sino también de realizar una amplia gama de tareas especializadas en organismos pluricelulares. Sin embargo, las células siguen las mismas leyes de la química y la física que determinan el comportamiento de los sistemas inertes. En consecuencia, la biología molecular moderna trata de entender los procesos moleculares en términos de reacciones físicas y químicas.

Este capítulo considera la composición química de las células y las propiedades de las moléculas responsables en último término de todas las actividades celulares. Se confiere a las proteínas especial énfasis debido a sus papeles diversos en la célula, incluyendo actuar como enzimas que catalizan casi todas las reacciones biológicas y como componentes clave de las membranas celulares. Las membranas son fundamentales en la estructura y la función celulares, dado que actúan como barreras que separan los distintos compartimentos acuosos. Por ejemplo, la membrana plasmática separa el contenido de la célula del entorno exterior, mientras que la membrana nuclear separa el contenido del núcleo del citoplasma. Las membranas están formadas por lípidos y proteínas y son impermeables a la mayoría de las moléculas hidrosolubles, con proteínas que se encargan del transporte selectivo de moléculas a través de la bicapa de fosfolípidos.

Moléculas de las células

Las células están compuestas de agua, iones inorgánicos y moléculas que contienen carbono (orgánicas). El agua es la molécula más abundante en las células, representando el 70% o más de la masa celular total. En consecuencia, las interacciones entre el agua y el resto de los componentes celulares tienen una importancia central en la química biológica. La propiedad crítica del agua al respecto es que es una molécula polar, donde los átomos de hidrógeno poseen una carga ligeramente positiva y el oxígeno posee una carga ligeramente negativa (**Fig. 2.1**). Debido a su naturaleza polar, las moléculas de agua pueden formar enlaces o puentes de hidrógeno entre sí o con otras moléculas polares, así como interaccionar con iones cargados positiva o negativamente. Como resultado de estas interacciones, los iones y las moléculas polares son fácilmente solubles en agua (**hidrófilas**). Por el contrario, las moléculas no polares, que no pueden interaccionar con el agua, son escasamente solubles en un medio acuoso (**hidrófobas**). En consecuencia, las moléculas no polares tienden a minimizar su contacto con el agua relacionándose estrechamente entre sí. Como se trata más adelante en este capítulo, las interacciones de moléculas polares y no polares con el agua y entre sí desempeñan papeles cruciales en la formación de estructuras biológicas,

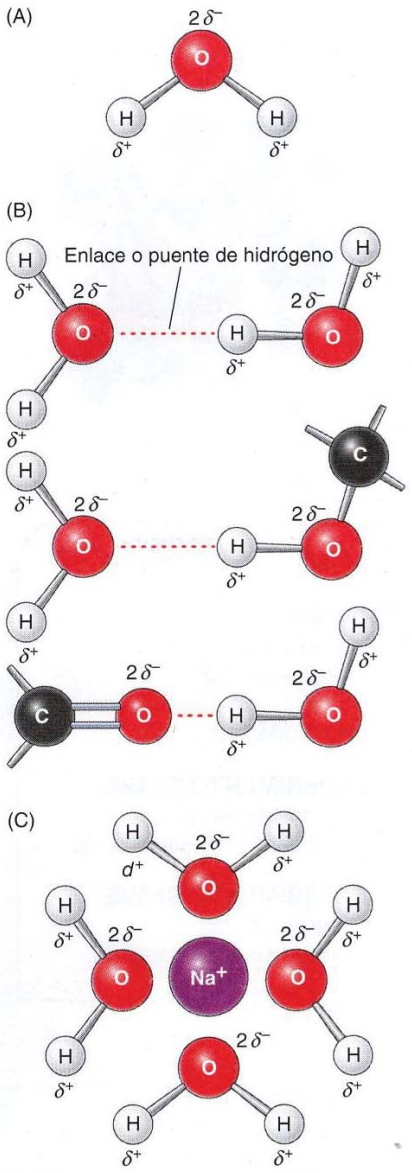


FIGURA 2.1 Características del agua. (A) El agua es una molécula polar, con una carga ligeramente negativa (δ^-) en el átomo de oxígeno y una carga ligeramente positiva (δ^+) en los átomos de hidrógeno. Debido a esta polaridad, las moléculas de agua pueden formar enlaces o puentes de hidrógeno (líneas discontinuas) bien entre sí o con otras moléculas polares (B), además de interaccionar con iones cargados (C).

como las membranas celulares. Los iones inorgánicos de la célula, incluyendo el sodio (Na^+), potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}), calcio (Ca^{2+}), fosfato (HPO_4^{2-}), cloro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-), constituyen un 1% o menos de la masa celular total. Estos iones están implicados en numerosos aspectos del metabolismo celular, y de este modo, desempeñan importantes papeles en la función celular.

Sin embargo, las moléculas orgánicas son los únicos componentes característicos de las células. La mayoría de estos componentes orgánicos pertenecen a una de cuatro clases de moléculas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas, los ácidos nucleicos y la mayoría de los carbohidratos (polisacáridos) son macromoléculas formadas por la unión (polimerización) de cientos o miles de precursores de bajo peso molecular: aminoácidos, nucleótidos o azúcares simples, respectivamente. Dichas macromoléculas constituyen entre el 80% y 90% del peso en seco de la mayoría de las células. Los lípidos son el otro constituyente principal de las células. El resto de la masa celular se compone de una variedad de pequeñas moléculas, incluyendo los precursores macromoleculares. La química básica de las células puede así entenderse en términos de las estructuras y funciones de cuatro tipos principales de macromoléculas orgánicas.

Carbohidratos

Los **carbohidratos** incluyen a los azúcares simples y a los polisacáridos. Estos azúcares simples, como la glucosa, son los nutrientes principales de las células. Como se trata en el Capítulo 3, su degradación proporciona no solo la fuente de energía celular sino el material inicial para la síntesis de otros componentes celulares. Los polisacáridos son formas de reserva de los azúcares y constituyen componentes estructurales de la célula. Además, los polisacáridos y polímeros más cortos de azúcares actúan como marcadores para una variedad de procesos de reconocimiento celular, incluyendo la adhesión entre células y el transporte de proteínas a los destinos intercelulares apropiados.

La estructura de los azúcares simples (**monosacáridos**) más representativa aparece en la **Figura 2.2.** La fórmula básica de estas moléculas es $(CH_2O)_n$, a partir de la cual procede el nombre de carbohidrato (C = «carbo» y H_2O = «hidrato»). El azúcar de seis átomos de carbono ($n = 6$), la glucosa, ($C_6H_{12}O_6$) es especialmente importante en las células, ya que proporciona la principal fuente de energía celular. Otros azúcares simples tienen entre tres y siete átomos de carbono, siendo los azúcares de tres y cinco carbonos los más comunes. Los azúcares que contienen cinco o más átomos de carbono pueden ciclarse para formar estructuras anulares, que constituyen las formas predominantes de estas moléculas dentro de las células. Como se refleja en la Figura 2.2, los azúcares ciclados existen en dos formas alternativas (llamadas α o β, dependiendo de la configuración del carbono 1.

Los monosacáridos pueden unirse entre sí mediante reacciones de deshidratación, donde se extrae H_2O y se unen los azúcares mediante un **enlace glicosídico** o **glucosídico** entre dos de sus átomos de carbono (**Fig. 2.3**). Si sólo se unen unos pocos azúcares, el polímero resultante se denomina **oligosacárido**. Si se implican un número elevado (cientos o miles) de azúcares, los polímeros resultantes son macromoléculas denominadas **polisacáridos**.

Los dos polisacáridos comunes —**glucógeno** y **almidón**— son las formas de depósito de carbohidratos en las células de animales y plantas respectiva-

ANIMACIÓN 2.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a2.1

Formación de enlaces. La polimerización de azúcares, aminoácidos y nucleótidos para formar polisacáridos, polipéptidos y ácidos nucleicos, respectivamente, ocurre a través de la formación de enlaces covalentes.

◆ El edulcorante artificial sucralosa (Splenda) es un derivado sintético del azúcar común en el que algunos de los grupos hidroxilo del azúcar han sido sustituidos por cloro.

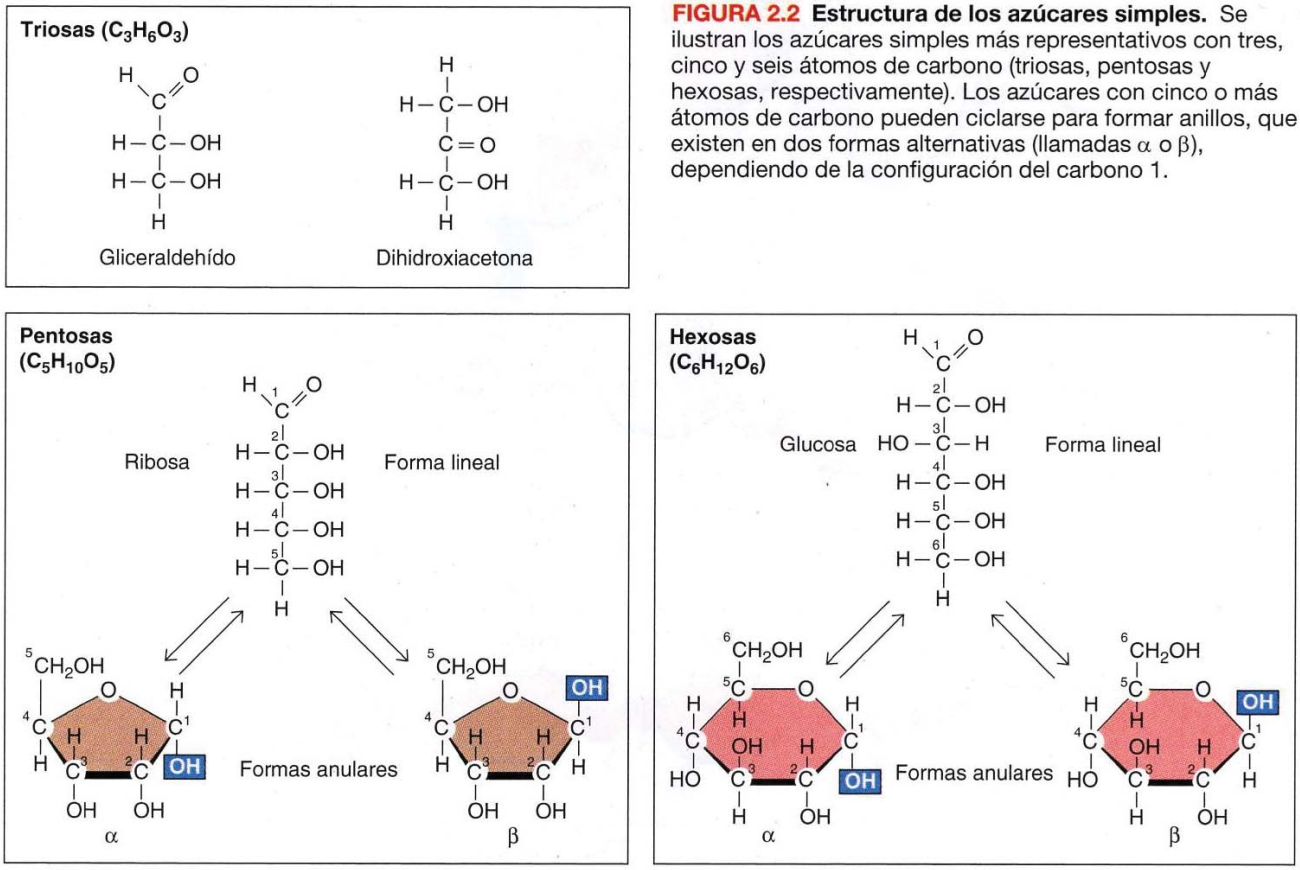


FIGURA 2.2 Estructura de los azúcares simples. Se ilustran los azúcares simples más representativos con tres, cinco y seis átomos de carbono (triosas, pentosas y hexosas, respectivamente). Los azúcares con cinco o más átomos de carbono pueden ciclarse para formar anillos, que existen en dos formas alternativas (llamadas α o β), dependiendo de la configuración del carbono 1.

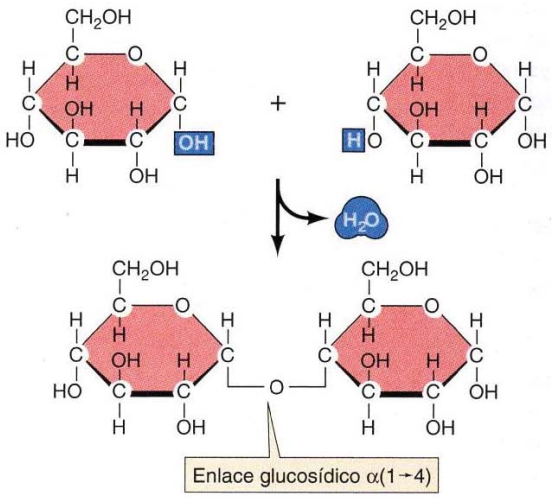


FIGURA 2.3 Formación de un enlace glucosídico. Dos azúcares simples se unen mediante una reacción de deshidratación (una reacción en la que se extrae agua). En el ejemplo ilustrado, dos moléculas de glucosa en la configuración α se unen mediante un enlace entre los carbonos 1 y 4, que por ello recibe el nombre de enlace glucosídico α(1→ 4).

mente. Tanto el glucógeno como el almidón están compuestos completamente de moléculas de glucosa en la configuración α (**Fig. 2.4**). El enlace principal se establece entre el carbono 1 de una glucosa y el carbono 4 de una segunda glucosa. Además, tanto el glucógeno como una forma de almidón (amilopectina) contienen enlaces ocasionales α(1→ 6), en los que el carbono 1 de una glucosa se une al carbono 6 de una segunda glucosa. Como se ve en la Figura 2.4, estos enlaces conllevan a la formación de ramificaciones que resultan de la unión de dos cadenas independientes de enlaces α(1→ 4). Estas ramificaciones están presentes en el glucógeno y la amilopectina, aunque otra forma de almidón (amilosa) es una molécula sin ramificaciones.

De este modo, las estructuras del glucógeno y del almidón son similares básicamente, como lo es su función: almacenar glucosa. La **celulosa**, en contraste, tiene una función bien definida como principal componente estructural de la pared de las células de las plantas. Quizá sorprendentemente, por tanto, la celulosa también se compone enteramente de moléculas de glucosa. Los residuos de glucosa de la celulosa, sin embargo, presentan una configuración β en vez de α, y la celulosa es un polisacárido no ramificado (véase Fig. 2.4). La unión de los residuos de glucosa por medio de enlaces β (1→ 4) en lugar de α (1→ 4) hace que la celulosa forme largas cadenas lineales que se empaquetan una junto a otra

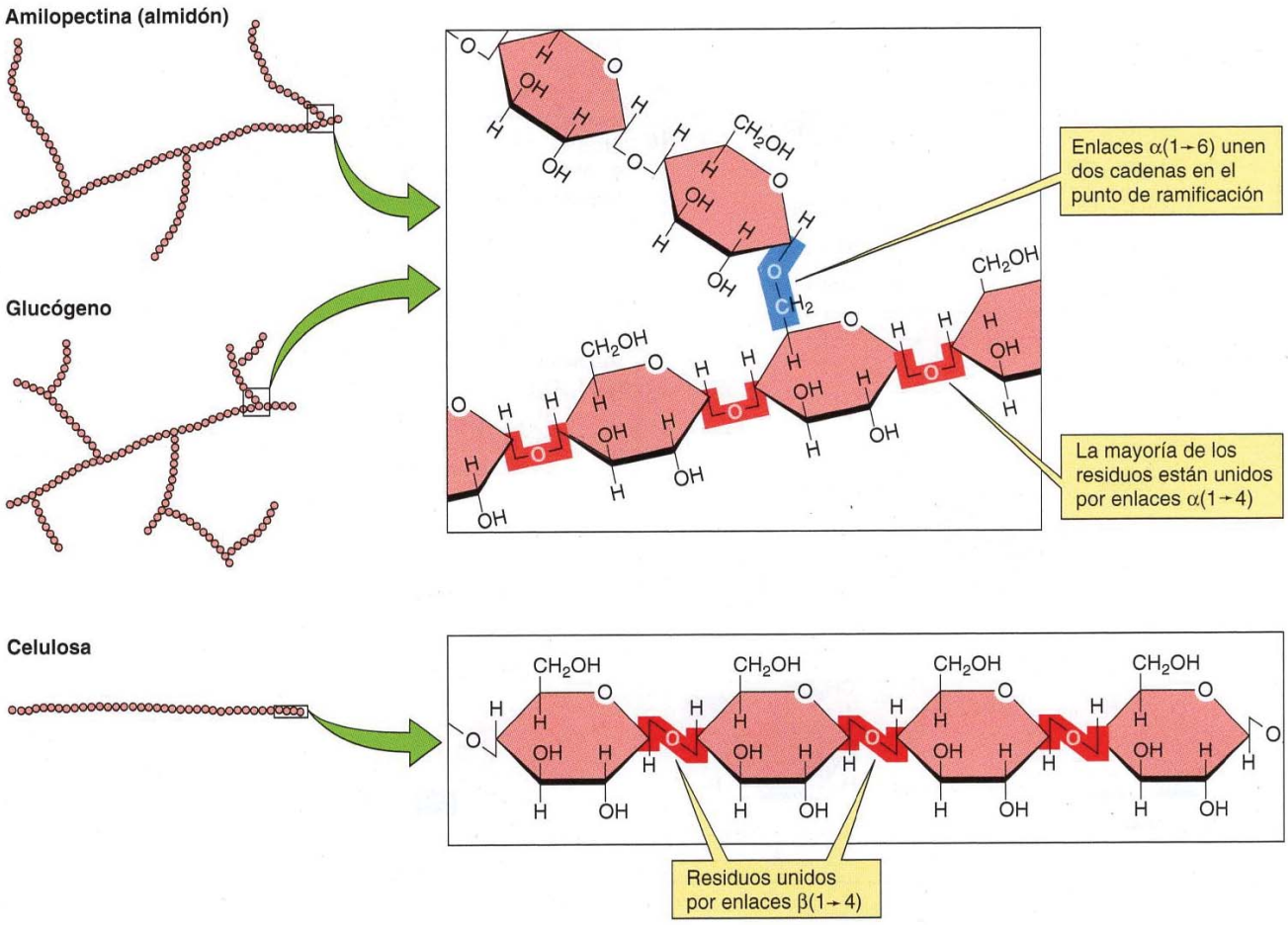


FIGURA 2.4 Estructura de los polisacáridos. Los polisacáridos son macromoléculas constituidas por cientos o miles de azúcares simples. El almidón, el glucógeno y la celulosa están todos compuestos únicamente por residuos de glucosa, que están unidos por enlaces glucosídicos α(1→4) en el almidón y el glucógeno, pero por enlaces β(1→4) en la celulosa. Una forma de almidón (amilopectina) y el glucógeno también presentan ocasionalmente enlaces α(1→6), que sirven como puntos de ramificación al unir dos cadenas independientes α(1→4).

para formar fibras con gran fuerza mecánica. El homólogo de la celulosa en los animales es la **quitina**, un polisacárido de residuos de glucosa modificados unidos por enlaces β que forma los exoesqueletos de insectos y crustáceos.

Además de sus papeles en el almacenamiento de energía y en la estructura celular, los oligosacáridos y los polisacáridos son importantes en una variedad de procesos de señalización celular. Por ejemplo, los oligosacáridos se encuentran frecuentemente ligados a proteínas, donde funcionan como marcadores para dirigir las proteínas a la superficie celular o para incorporarlas a distintas organelas subcelulares. Los oligosacáridos y los polisacáridos también funcionan como marcadores en la superficie celular, desempeñando importantes papeles en el reconocimiento celular y en las interacciones entre células en los tejidos de los organismos pluricelulares.

Lípidos

Los **lípidos** desempeñan tres funciones básicas en las células. Primero, proporcionan una importante fuente de energía. Después, y de gran importancia en la biología celular, los lípidos son el componente principal de las membranas celulares. Y, por último, los lípidos desempeñan importantes papeles en la señalización celular, bien como hormonas esteroideas (p. ej., estrógeno y testosterona), o como mensajeros moleculares que trasladan señales desde los receptores de la superficie celular hasta dianas dentro de la célula.

Los lípidos más simples son los **ácidos grasos**, consistentes en largas cadenas hidrocarbonadas, que con mayor frecuencia contienen 16 o 18 átomos de carbono, con un grupo carboxilo (COO^-) en un extremo (**Fig. 2.5**). Los ácidos grasos no saturados contienen uno o más dobles enlaces entre áto-

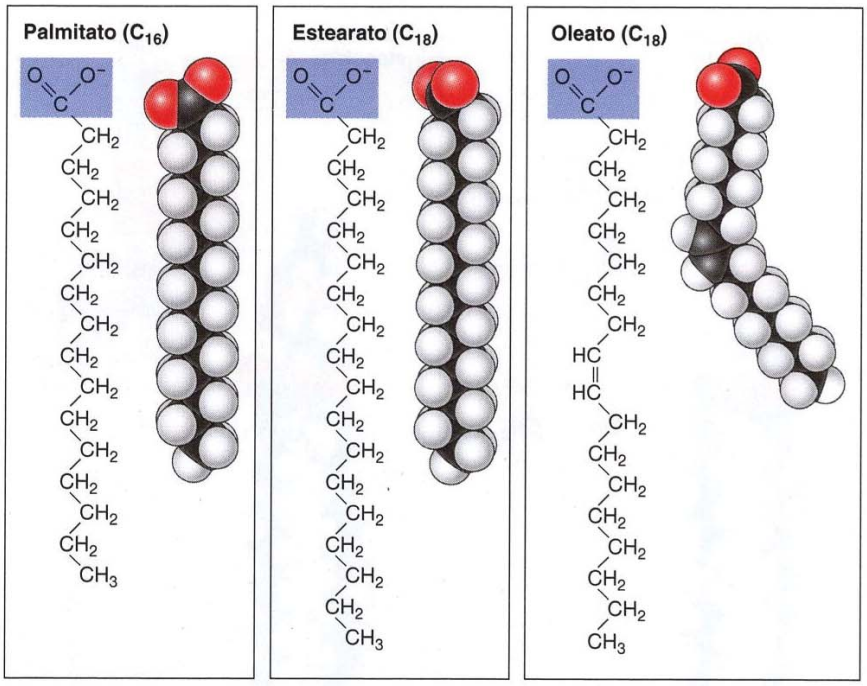
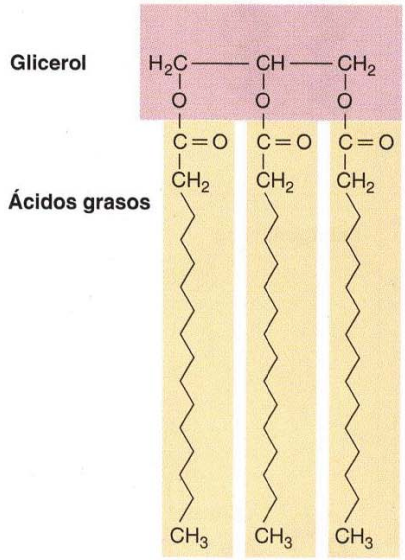
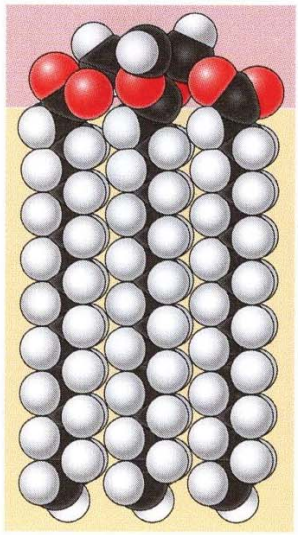


FIGURA 2.5 Estructura de los ácidos grasos. Los ácidos grasos consisten en largas cadenas hidrocarbonadas que terminan en un grupo carboxilo (COO^-). El palmitato y el estearato son ácidos grasos saturados que constan de 16 y 18 átomos de carbono respectivamente. El oleato es un ácido graso insaturado de 18 carbonos que contiene un doble enlace entre los carbonos 9 y 10. Observen que el doble enlace produce un acodamiento en la cadena hidrocarbonada.

◆ El nivel alto de triglicéridos en sangre está relacionado con el aumento del riesgo de ataque cardíaco.



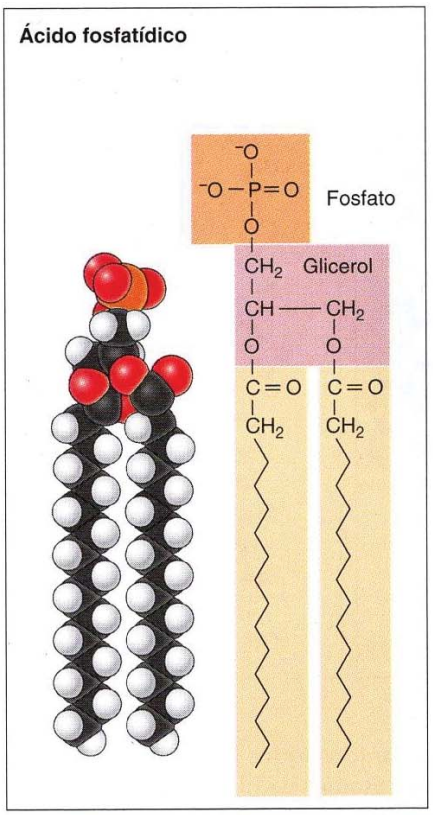


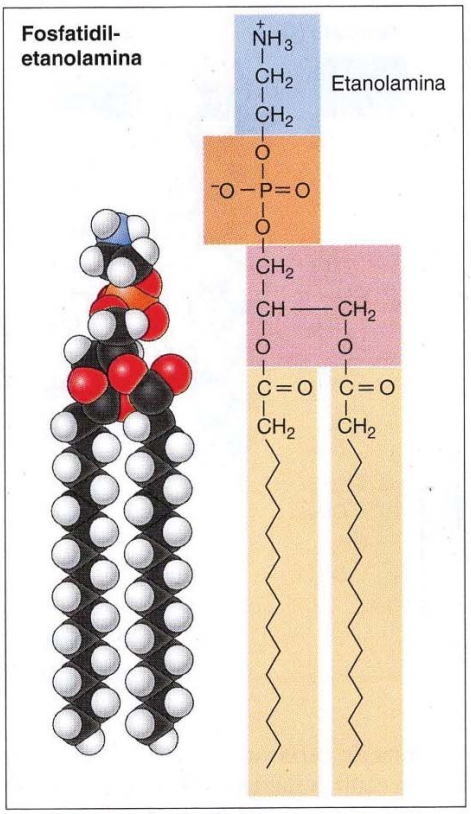
mos de carbono; en los ácidos grasos saturados todos los átomos de carbono están enlazados al máximo número de átomos de hidrógeno posible. Las cadenas hidrocarbonadas largas de ácidos grasos contienen sólo enlaces C—H no polares, que son incapaces de interaccionar con el agua. La naturaleza hidrófoba de estas cadenas de ácidos grasos es responsable de buena parte del comportamiento de los lípidos complejos, particularmente en la formación de las membranas biológicas.

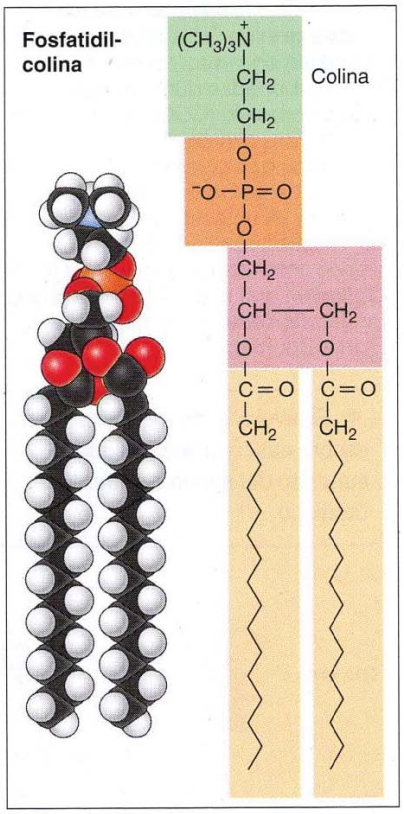
Los ácidos grasos se almacenan en forma de **triacilgliceroles** (también llamados **triglicéridos** o **grasas**), que consisten en tres ácidos grasos ligados a una molécula de glicerol (**Fig. 2.6**). Los triglicéridos son insolubles en agua y, por tanto, se acumulan como gotas de grasa en el citoplasma. Cuando es necesario, pueden ser degradados para su utilización como moléculas procuradoras de energía (véase Cap. 3). Es de destacar que los ácidos grasos son una forma de almacenamiento de energía más eficaz que los carbohidratos, produciendo más del doble de energía por peso de material degradado. Las grasas, por tanto, permiten que se almacene energía en menos de la mitad del peso corporal que se requeriría para almacenar la misma cantidad de energía en carbohidratos —una consideración particularmente importante para los animales debido a su movilidad.

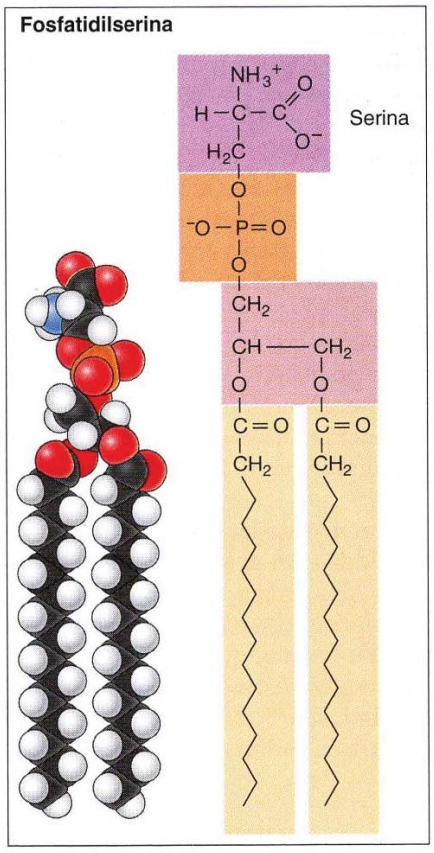
Los **fosfolípidos**, los principales componentes de las membranas celulares, se componen de dos ácidos grasos unidos a un grupo polar de cabeza (**Fig. 2.7**). En los **fosfoglicéridos**, los dos ácidos grasos están ligados a átomos de carbono del glicerol, como en los triglicéridos. El tercer carbono del glicerol, sin embargo, está ligado a un grupo fosfato, que a su vez está frecuentemente unido a otra molécula polar pequeña, como la etanolamina colina, la serina o el inositol. La **esfingomielina**, el único fosfolípido no glicérico de las membranas celulares, contiene dos cadenas hidrocarbonadas

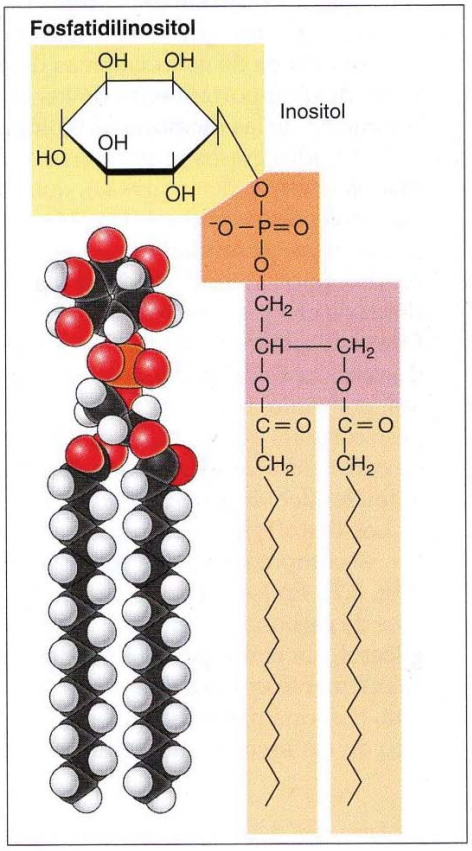
FIGURA 2.6 Estructura de los triglicéridos. Los triglicéridos (grasas) contienen tres ácidos grasos unidos a glicerol. En este ejemplo, los tres ácidos grasos son palmitato, pero los triglicéridos con frecuencia contienen una mezcla de distintos ácidos grasos.

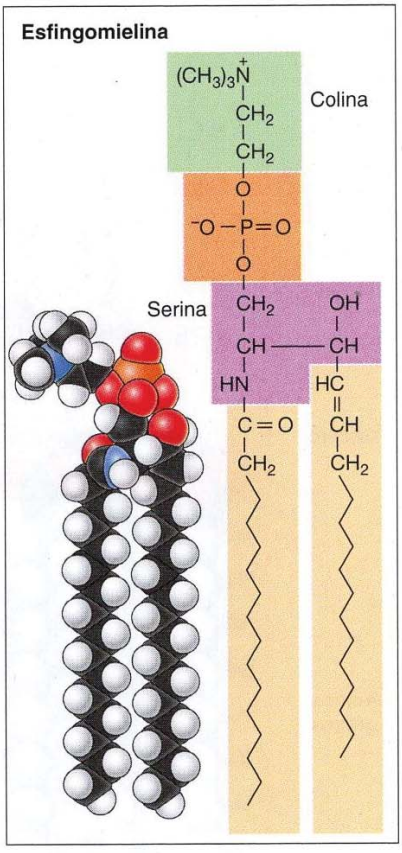

Ácido fosfatídico
Fosfato
Glicerol


Fosfatidil-
etanolamina
Etanolamina


Fosfatidil-
colina
Colina


Fosfatidilserina
Serina


Fosfatidilinositol
Inositol


Esfingomielina
Colina
Serina

◀ **FIGURA 2.7 Estructura de los fosfolípidos.** Los fosfoglicéridos contienen dos ácidos grasos unidos al glicerol. Los ácidos grasos pueden ser diferentes entre sí. El tercer carbono del glicerol está ligado a un grupo fosfato (formando ácido fosfatídico), que a su vez está frecuentemente unido a otra molécula polar pequeña (formando fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, o fosfatidilinositol). En la esfingomielina dos cadenas hidrocarbonadas se unen a un grupo polar de cabeza formado por serina en vez de glicerol.

unidas a un grupo polar de cabeza formado por serina en vez de glicerol. Todos los fosfolípidos tienen colas hidrófobas, consistentes en las dos cadenas hidrocarbonadas, y grupos hidrófilos de cabeza, consistentes en el grupo fosfato y sus uniones polares. Consecuentemente, los fosfolípidos son moléculas **anfipáticas**, en parte solubles en agua y en parte insolubles. Esta propiedad de los fosfolípidos es la base para la formación de membranas biológicas, como ya se detalla más adelante en este capítulo.

Además de los fosfolípidos, muchas membranas celulares contienen **glicolípidos** y **colesterol**. Los glicolípidos se componen de dos cadenas hidrocarbonadas ligadas a grupos polares de cabeza que contienen carbohidratos (**Fig. 2.8**). Son de esta forma similares a los fosfolípidos en su organización general como moléculas anfipáticas. El colesterol, por el contrario, consta de cuatro anillos hidrocarbonados en vez de cadenas lineales hidrocarbonadas (**Fig. 2.9**). Los anillos hidrocarbonados son intensamente hidrófobos, pero el grupo hidroxilo (OH) unido a un extremo del colesterol es débilmente hidrófilo, así que el colesterol también es anfipático.

Además de su papel como componentes de membranas celulares, los lípidos funcionan como moléculas de señalización, tanto dentro como fuera de las células. Las **hormonas esteroideas** (como la testosterona y los estrógenos) son derivados del colesterol (véase Fig. 2.9). Las hormonas son un grupo variado de mensajeros químicos; todos ellos contienen cuatro anillos hidrocarbonados a los que se unen grupos funcionales específicos. Los derivados de los fosfolípidos también funcionan como mensajeros celulares dentro de las células, actuando para transmitir señales desde los receptores de la superficie celular hasta sus dianas intracelulares, que regulan una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, el movimiento, la supervivencia y la diferenciación (véase Cap. 16).

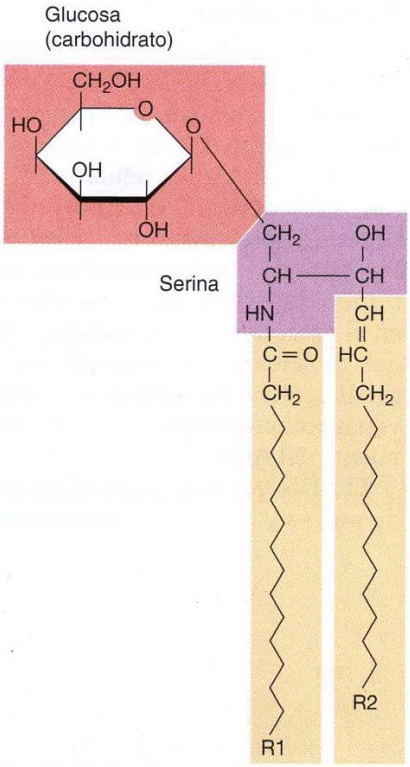


FIGURA 2.8 Estructura de los glicolípidos. Dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo polar de cabeza formado por serina y que contienen carbohidratos (p. ej., glucosa).

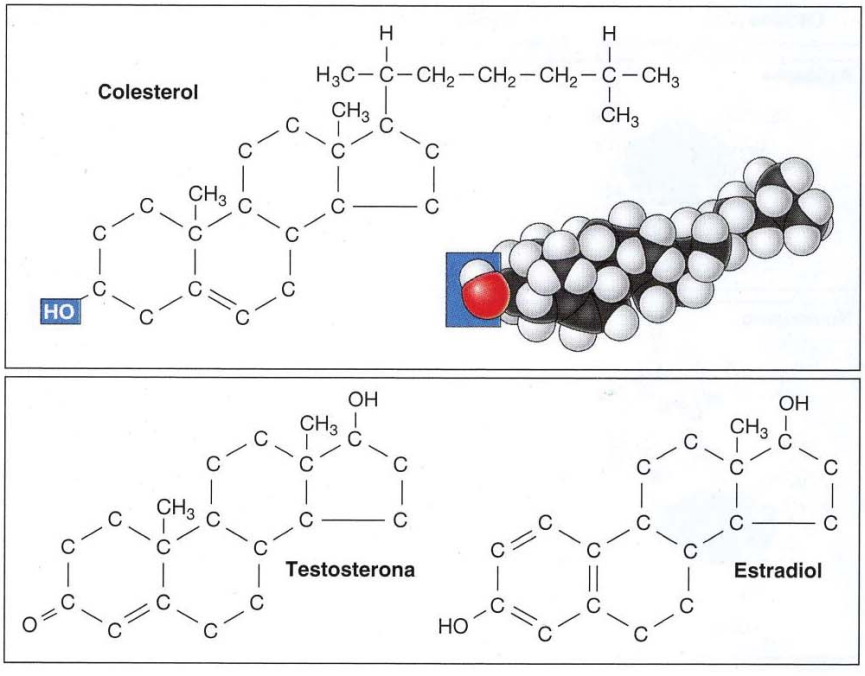


FIGURA 2.9 Colesterol y hormonas esteroideas. El colesterol, un importante componente de las membranas celulares, es una molécula anfipática debido a su grupo polar hidroxilo. El colesterol también es un precursor de las hormonas esteroideas, como la testosterona y el estradiol (un tipo de estrógeno). Los átomos de carbono ligados a los anillos de carbono no están representados en esta figura.

Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos —ADN y ARN— son las principales moléculas de información de la célula. El **ácido desoxirribonucleico (ADN)** desempeña un papel único como material genético, que en las células eucariotas se encuentra en el núcleo. Distintos tipos de **ácido ribonucleico (ARN)** participan en distintas actividades celulares. El **ARNmensajero (ARNm)** transporta información desde el ADN a los ribosomas, donde sirve como molde para la síntesis de proteínas. Otros dos tipos de ARN **(ARN ribosómico** y **ARN de transferencia)** están implicados en la síntesis de proteínas. Además, otras formas de ARN están implicadas en la regulación de la expresión génica y en el procesamiento y transporte tanto del ARN como de proteínas. Además de actuar como una molécula informativa, el ARN también es capaz de catalizar diversas reacciones químicas. En las células actuales, estas incluyen reacciones implicadas tanto en la síntesis proteica como en el procesamiento del ARN.

El ADN y el ARN son polímeros de **nucleótidos**, que consisten en bases de **purina** y **pirimidina** ligadas a azúcares fosforilados (**Fig. 2.10**). El ADN

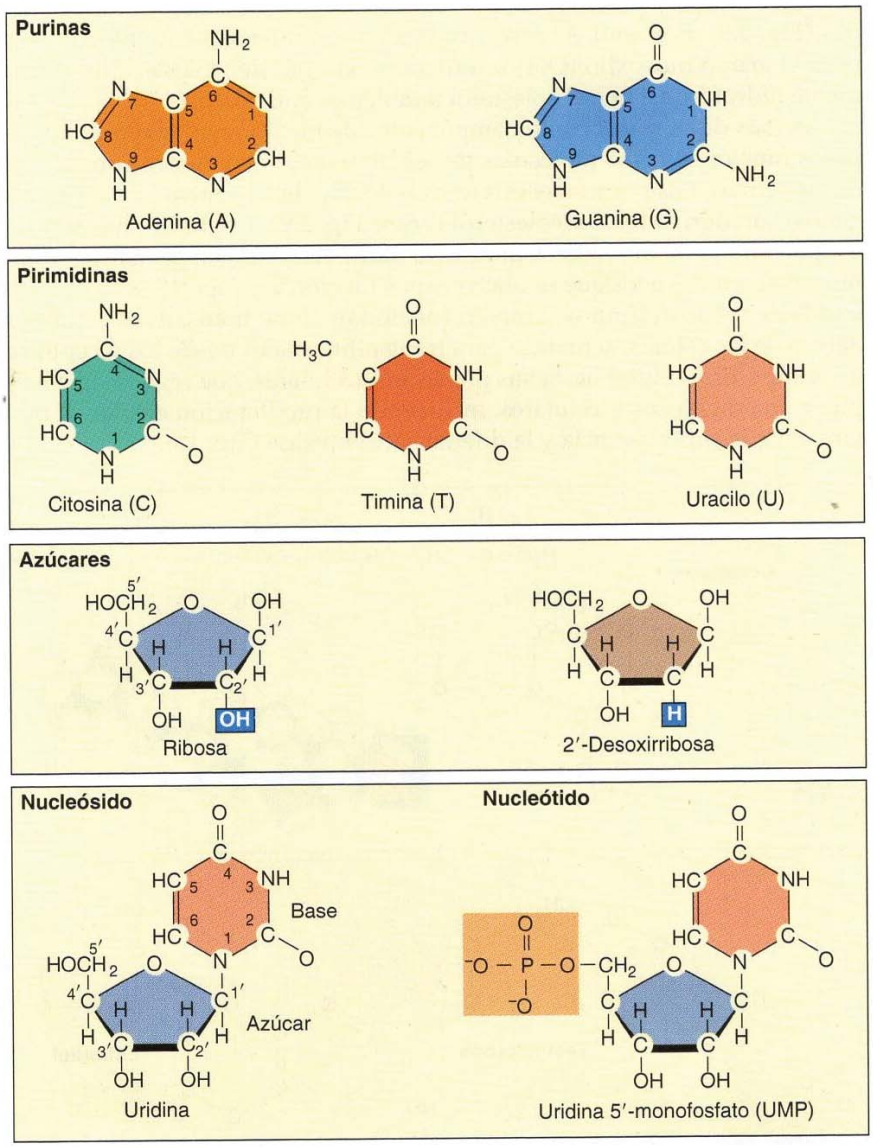


FIGURA 2.10 Componentes de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos contienen bases purínicas y pirimidínicas ligadas a azúcares fosforilados. Una base de un ácido nucleico ligada sólo a un azúcar es un nucleósido. Los nucleótidos además contienen uno o más grupos fosfato.

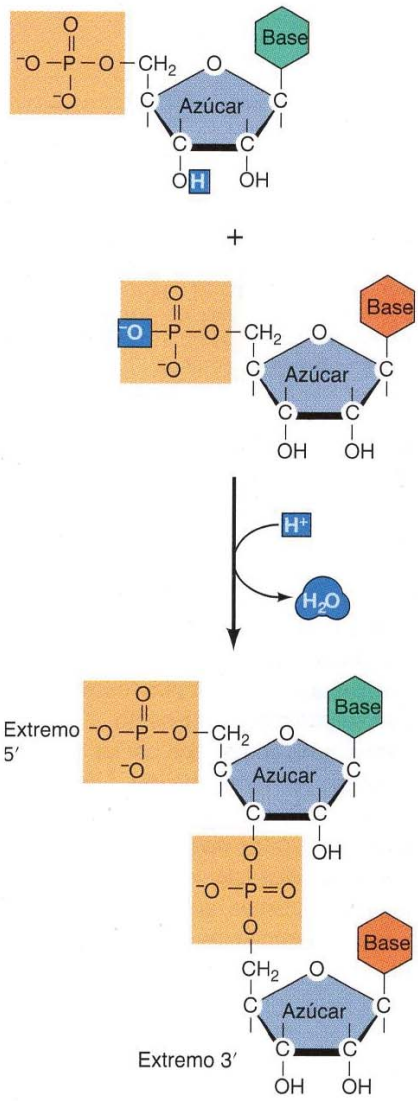


FIGURA 2.12 Emparejamiento complementario entre bases del ácido nucleico. La formación de enlaces de hidrógeno entre bases en hebras opuestas de ADN conduce al apareamiento específico de citosina (C) con guanina (G) y de la timina (T) con adenina (A).

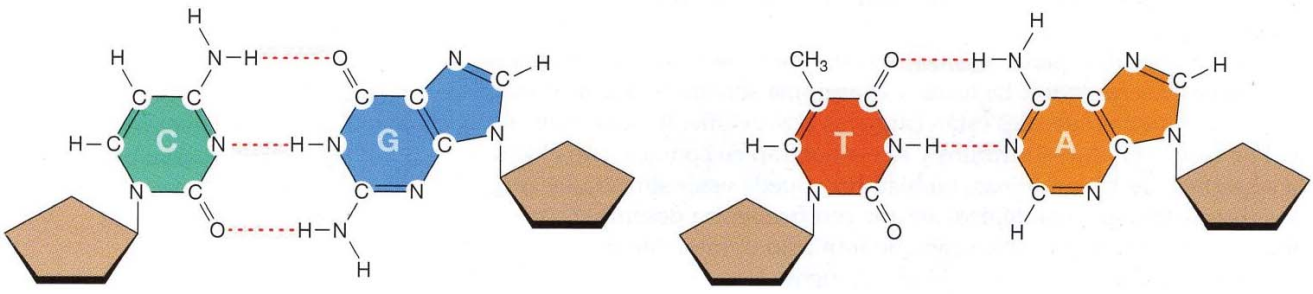
FIGURA 2.11 Polimerización de los nucleótidos. Los nucleótidos se unen mediante enlaces fosfodiéster entre los grupos hidroxilo 3′ y 5′. El extremo 5′ de una cadena de nucleótidos termina en un grupo fosfato, y el extremo 3′ finaliza en un grupo hidroxilo.

contiene dos purinas (**adenina** y **guanina**) y dos pirimidinas (**citosina** y **timina**). Adenina, guanina y citosina también están presentes en el ARN, pero el ARN contiene **uracilo** en lugar de timina. Las bases están ligadas a azúcares (**2′-desoxirribosa** en el ADN, o **ribosa** en el ARN) para formar **nucleósidos**. Los nucleótidos además contienen uno o más grupos fosfato ligados al carbono 5′ de los azúcares de los nucleósidos.

La polimerización de nucleótidos para formar ácidos nucleicos implica la formación de **enlaces fosfodiéster** entre el 5′ fosfato de un nucleótido y el 3′ hidroxilo de otro (**Fig. 2.11**). Los **oligonucleótidos** son pequeños polímeros que contienen sólo unos pocos nucleótidos; los **polinucleótidos** mayores que componen el ARN y el ADN celular pueden contener miles o millones de nucleótidos respectivamente. Es importante señalar que una cadena polinucleotídica tiene un sentido, con un extremo de la cadena terminando en un grupo 5′ fosfato y el otro en un grupo 3′ hidroxilo. Los polinucleótidos siempre se sintetizan en la dirección 5′ a 3′, añadiéndose un nucleótido libre al grupo 3′ OH de la cadena en formación. Por convención, la secuencia de bases en el ADN o ARN también se escribe en la dirección 5′ a 3′.

La información del ADN y del ARN se transmite por el orden de las bases en la cadena polinucleotídica. El ADN es una molécula de doble hebra que consiste en dos cadenas de polinucleótidos que discurren en direcciones opuestas con respecto a sus extremos 5′ y 3′ (véase Cap. 4). Las bases se encuentran en la parte interna de la molécula, y las dos cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias. La guanina se aparea con la citosina y la adenina lo hace con la timina (**Fig. 2.12**). La principal consecuencia de este emparejamiento complementario es que una hebra de ADN (o cadena de ARN) puede actuar como molde para dirigir la síntesis de una cadena complementaria. Los ácidos nucleicos son, por tanto, excepcionalmente capaces de dirigir su autorreplicación, permitiéndoles funcionar como las moléculas de información fundamentales de la célula. La información transportada por el ADN y el ARN dirige la síntesis de proteínas específicas, que controlan la mayoría de la actividad celular.

Los nucleótidos no sólo son importantes como los ladrillos de construcción de los ácidos nucleicos; también desempeñan papeles vitales en otros procesos celulares. Quizá el ejemplo más destacado es el adenosín 5′ trifosfato (ATP), que es la principal forma de energía química dentro de las células. Otros nucleótidos funcionan de manera similar como transportadores de energía o de grupos químicos reactivos en una gran variedad de reacciones metabólicas. Además, algunos nucleótidos (p. ej., AMP cíclico) son importantes moléculas de señalización dentro de las células (véase Cap. 16).



Proteínas

Mientras que los ácidos nucleicos transportan la información genética de la célula, la responsabilidad básica de las **proteínas** es ejecutar las tareas dirigidas por esa información. Las proteínas son las más variadas de todas las macromoléculas, y cada célula contiene miles de proteínas diferentes, que realizan una amplia gama de funciones. Los papeles de las proteínas incluyen servir como componentes estructurales de células y tejidos, actuar en el transporte de pequeñas moléculas (p. ej., en el transporte de glucosa y otros nutrientes dentro de la célula), transmitir información entre células (p. ej., hormonas proteicas), y proporcionar una defensa frente a la infección (p. ej., anticuerpos). La propiedad fundamental de las proteínas, sin embargo, es su capacidad para actuar como enzimas, que, como se trata en la siguiente sección, catalizan casi todas las reacciones químicas en los sistemas biológicos. De este modo, las proteínas dirigen virtualmente todas las actividades de la célula. La importancia central de las proteínas en la química biológica viene determinada por su nombre, derivado de la palabra griega *proteios*, que significa «de primer rango».

Las proteínas son polímeros sintetizados de 20 **aminoácidos** distintos. Cada aminoácido consiste en un átomo de carbono (llamado carbono α) ligado a un grupo carboxilo (COO–), un grupo amino (NH_3^+), un átomo de hidrógeno, y una cadena lateral característica (**Fig. 2.13**). Las propiedades químicas específicas de las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos determinan los papeles de cada aminoácido en la estructura y función proteica. Los aminoácidos pueden agruparse en cuatro amplias categorías dependiendo de las propiedades de sus cadenas laterales (**Fig. 2.14**). Diez aminoácidos tienen cadenas laterales no polares que no interaccionan con el agua. La glicina es el aminoácido más simple, con una cadena lateral consistente en un sólo átomo de hidrógeno. La alanina, valina, leucina e isoleucina tienen cadenas laterales hidrocarbonadas compuestas por hasta cuatro átomos de carbono. Las cadenas laterales de estos aminoácidos son hidrófobas y de ahí que tiendan a localizarse en el interior de las proteínas o en las membranas, donde no se encuentran en contacto con el agua. Del mismo modo, la fenilalanina y el triptófano tienen cadenas laterales muy hidrófobas, con anillos aromáticos. La prolina también tiene una cadena lateral hidrocarbonada, pero es la única cuya cadena lateral está unida al nitrógeno del grupo amino además de al carbono α, formando una estructura cíclica. Las cadenas laterales de dos aminoácidos, cisteína y metionina, contienen átomos de azufre. La metionina es bastante hidrófoba, pero la cisteína no lo es tanto gracias a su grupo sulfhidrilo (SH). Como comentaremos posteriormente, el grupo sulfhidrilo de la cisteína es muy importante en la estructura proteica, porque pueden formarse enlaces disulfuro entre las cadenas laterales de distintos residuos de cisteína.

Cinco aminoácidos tienen cadenas laterales sin carga pero polares. Estos incluyen la serina, la treonina y la tirosina (que tienen grupos hidroxilo en sus cadenas laterales), así como la asparragina y la glutamina (que tiene grupos amida [$O{=}C{-}NH_2$] polares). Debido a que las cadenas laterales de estos aminoácidos pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua, estos aminoácidos son hidrófobos y tienden a localizarse en la parte externa de las proteínas.

Los aminoácidos lisina, arginina e histidina tienen cadenas laterales con grupos básicos cargados. La lisina y la arginina son aminoácidos muy básicos, y sus cadenas laterales están cargadas positivamente dentro de la célula. Por tanto, son muy hidrófilos y se encuentran en contacto con el agua en la superficie de las proteínas. La histidina puede estar sin carga o cargada positivamente a pH fisiológico, así que con frecuencia desempeña un papel activo en reacciones enzimáticas que implican el intercambio de iones hidrógeno, como se trata en el capítulo siguiente.

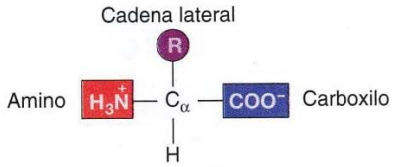


FIGURA 2.13 Estructura de los aminoácidos. Cada aminoácido consiste en un átomo de carbono central (el carbono α) ligado a un átomo de hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y una cadena lateral específica (denominada R). A pH fisiológico, tanto el grupo carboxilo como el amino se encuentran ionizados, como se muestra en la figura.

◆ Aparte de ser las unidades de construcción de las proteínas, los aminoácidos tienen otra función biológica importante como moléculas empleadas por las células para comunicarse. Los aminoácidos glicina y glutamato, junto con otros diversos aminoácidos que no se encuentran en las proteínas, actúan como neurotransmisores (véase Cap. 16).

Las proteínas muestran una diversidad increíble. Algunas proteínas poco frecuentes incluyen:

- Proteínas de cemento que son empleadas por los percebes para adherirse a las superficies sumergidas bajo el agua. Los científicos están intentando desarrollar estas proteínas para su uso industrial como pegamentos o recubrimientos anticorrosivos.
- La seda de la araña de la Orbe Dorada es extremadamente ligera y flexible pero casi tan fuerte como Kevlar, que se emplea para fabricar los chalecos antibalas.

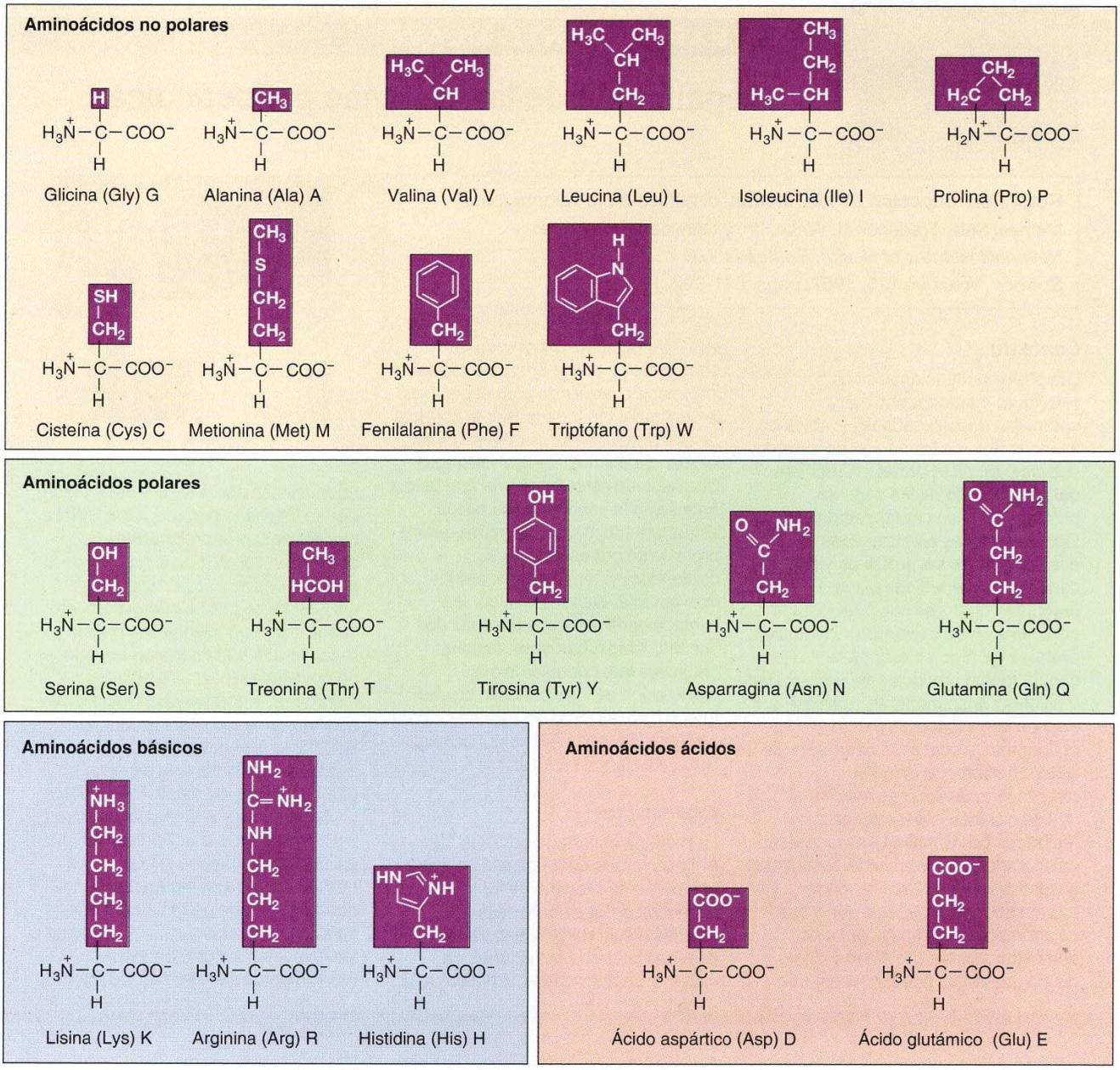


FIGURA 2.14 Aminoácidos. Se indican las abreviaturas de tres y una letra para cada aminoácido. Los aminoácidos se agrupan en cuatro amplias categorías dependiendo de las propiedades de sus cadenas laterales: no polares, polares, básicas y ácidas.

VÍDEO 2.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v2.1

¿Qué es una proteína? Todas las proteínas están formadas por los mismos veinte aminoácidos, combinados y plegados de diferentes formas; esta estructura tridimensional es básica para la función de las proteínas.

Por último, dos aminoácidos, el ácido aspártico y el ácido glutámico, tienen cadenas laterales ácidas que terminan en grupos carboxilo. Estos aminoácidos están cargados negativamente dentro de la célula y, por tanto, a menudo se denominan aspartato y glutamato. Como los aminoácidos básicos, estos aminoácidos son muy hidrófilos y habitualmente se localizan en la superficie de las proteínas.

Los aminoácidos están unidos por **enlaces peptídicos** entre el grupo α carboxilo de un aminoácido y el grupo α amino del siguiente (**Fig. 2.15**). Los **polipéptidos** son cadenas lineales de aminoácidos, habitualmente de cientos o miles de aminoácidos de longitud. Cada cadena polipeptídica tiene

EXPERIMENTO CLAVE

Plegamiento de las cadenas polipeptídicas

Rotura de reducción de los puentes disulfuro en la ribonucleasa
Michael Sela, Frederick H. White, Jr., y Christian B. Anfinsen
National Institutes of Health, Bethesda, MD
Science, Volumen 125, 1957, págs. 691-692

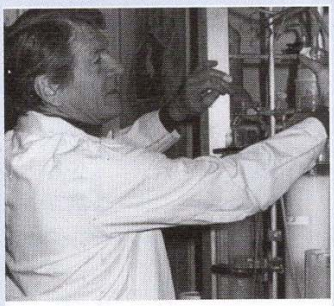
Contexto

Las proteínas funcionales son estructuralmente mucho más complejas que las cadenas lineales de aminoácidos. La formación de enzimas activas o de otras proteínas requiere del plegamiento de las cadenas polipeptídicas en configuraciones tridimensionales precisas. Esta diferencia entre las proteínas y las cadenas polipeptídicas plantea preguntas cruciales con relación a la comprensión de la estructura y función proteica. ¿Cómo se escoge la configuración proteica adecuada de las múltiples configuraciones posibles que podrían ser adoptadas por un polipéptido, y cuál es la naturaleza de la información que dirige el plegamiento de las proteínas?

Los clásicos experimentos realizados por Christian Anfinsen y sus colaboradores proporcionan respuestas a estas preguntas. Estudiando la enzima ribonucleasa, Anfinsen y sus colaboradores fueron capaces de demostrar que las proteínas desnaturalizadas pueden replegarse espontáneamente adoptando una configuración activa. Por tanto, toda la información requerida para especificar la configuración tridimensional correcta de una proteína está contenida en su secuencia primaria de aminoácidos. Una serie de estos experimentos llevó a Anfinsen a la conclusión de que la estructura tridimensional nativa de una proteína se corresponde a su conformación termodinámicamente más estable, determinada por las interacciones entre sus aminoácidos constituyentes. Las observaciones originales que condujeron a la formulación de este principio crucial fueron comunicadas en este artículo de 1957 por Christian Anfinsen, Michael Sela y Frederick White Jr.

Experimentos

La proteína estudiada por Sela, White y Anfinsen era la ribonucleasa bovina, una pequeña proteína de 124 aminoácidos que contiene cuatro enlaces disulfuro (S-S) entre las cadenas laterales de residuos de cisteína. La actividad enzimática de la ribonucleasa podía estar determinada por su habilidad para degradar ARN a nucleótidos, proporcionando una evaluación sencilla de la función de la proteína nativa. Esta actividad enzimática se perdía completamente cuando la ribonucleasa se sometía a tratamientos que alteraban los enlaces no covalentes (p. ej., los enlaces de hidrógeno) o desdoblaban los enlaces disulfuro al reducirlos a grupos sulfihidrilo (SH). La proteína desnaturalizada parecía así estar en una conformación aleatoria inactiva.



Christian B. Anfinsen

Sela, White y Anfinsen observaron, algo crucial, que la actividad enzimática reaparece si la proteína desnaturalizada se incubaba en condiciones que permitía a la cadena polipeptídica replegarse y reformarse a los enlaces disulfuro. En estos experimentos se retiraban los agentes

dos extremos distintivos, uno terminando en un grupo α amino (el extremo amino, o N terminal) y el otro en un grupo α carboxilo (el extremo carboxi, o C, terminal). Los polipéptidos se sintetizan desde el extremo amino al carboxilo terminal, y la secuencia de aminoácidos en un polipéptido se escribe (por convención) en el mismo orden.

La característica definitoria de las proteínas es que son polipéptidos con secuencias de aminoácidos específicas. En 1953, Frederick Sanger fue el primero en determinar la secuencia completa de aminoácidos de una proteína, la hormona insulina. Se encontró que la insulina estaba constituida por dos cadenas polipeptídicas, unidas por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína (**Fig. 2.16**). Lo que era más importante, el experimento de Sanger reveló que cada proteína consiste en una secuencia específica de aminoácidos. Actualmente las secuencias proteicas se suelen deducir a partir de secuencias de ARNm, y se han determinado las secuencias aminoacídicas de más de 100.000 proteínas. Cada una consiste en una secuencia única de aminoácidos, determinada por el orden de los nucleótidos en un gen (véase Cap. 4).

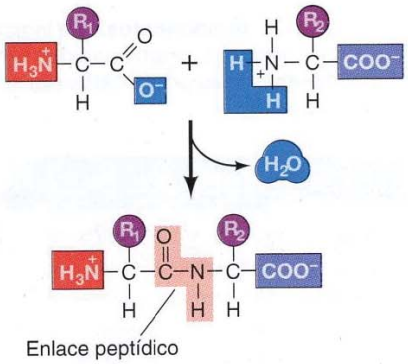
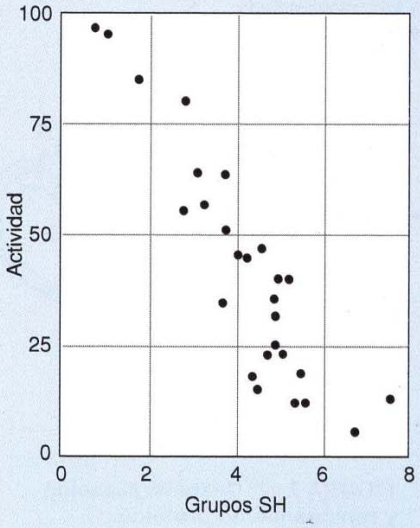


FIGURA 2.15 Formación de un enlace peptídico. El grupo carboxilo de un aminoácido se liga al grupo amino de otro.

EXPERIMENTO CLAVE



Resumen de los resultados de los experimentos de renaturalización. La actividad enzimática de la ribonucleasa se representa como función del número de grupos sulfhidrilo (SH) presentes después de diversos tratamientos. La formación de grupos SH corresponde a la pérdida de enlaces disulfuro. La actividad se expresa como porcentaje de actividad de la enzima nativa.

desnaturalizantes, y la enzima inactivada era incubada a temperatura ambiente en un tampón fisiológico en presencia de O_2. Este procedimiento llevó a la oxidación de los grupos sulfhidrilo y a la reformación de los enlaces disulfuro. Durante este proceso, la enzima recuperó su actividad catalítica, indicando que se había replegado a su configuración nativa (véase figura). Debido a que no estaba presente ningún otro componente celular, toda la información requerida para el plegamiento proteico adecuado parecía estar contenida en la secuencia primaria de aminoácidos de la cadena polipeptídica.

Impacto

Experimentos posteriores definieron las condiciones bajo las que la ribonucleasa desnaturalizada recuperaba completamente su estructura nativa y su actividad enzimática, estableciendo la «hipótesis termodinámica» del plegamiento proteico —esto es, la estructura nativa tridimensional de una proteína corresponde al estado termodinámicamente más estable en condiciones fisiológicas—. La estabilidad termodinámica está gobernada por las interacciones de los aminoácidos constitutivos, así que la configuración tridimensional de las proteínas está determinada directamente por su secuencia de aminoácidos. Puesto que el orden de los nucleótidos en el ADN especifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, se deduce que la secuencia de nucleótidos de un gen contiene toda la información necesaria para determinar la estructura tridimensional de su producto proteico.

Aunque el trabajo de Anfinsen estableció la base termodinámica del plegamiento proteico, comprender el mecanismo de este proceso continúa siendo un área de investigación activa. El plegamiento proteico es extremadamente complejo, y todavía somos incapaces de deducir la estructura tridimensional de una proteína directamente de su secuencia de aminoácidos. También es importante destacar que el plegamiento espontáneo de las proteínas *in vitro* es mucho más lento que el plegamiento proteico dentro de la célula, que es asistido por enzimas (véase Cap. 9). El plegamiento proteico continúa siendo de este modo un desafío central en la química biológica.

La secuencia de aminoácidos de una proteína es sólo el primer elemento de su estructura. En vez de ser cadenas prolongadas de aminoácidos, las proteínas adoptan configuraciones tridimensionales características que son cruciales para su función. Estas configuraciones tridimensionales de las proteínas son el resultado de las interacciones entre sus aminoácidos constituyentes, así que la forma de las proteínas viene determinada por su secuencia de aminoácidos. Esto fue demostrado por primera vez por los expe-

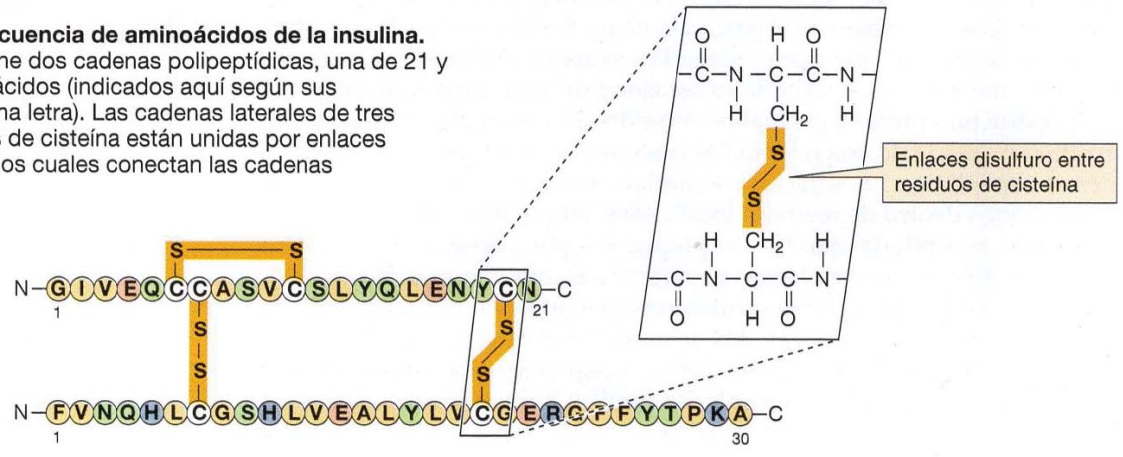


FIGURA 2.16 Secuencia de aminoácidos de la insulina. La insulina contiene dos cadenas polipeptídicas, una de 21 y otra de 30 aminoácidos (indicados aquí según sus abreviaturas de una letra). Las cadenas laterales de tres pares de residuos de cisteína están unidas por enlaces disulfuro, dos de los cuales conectan las cadenas polipeptídicas.

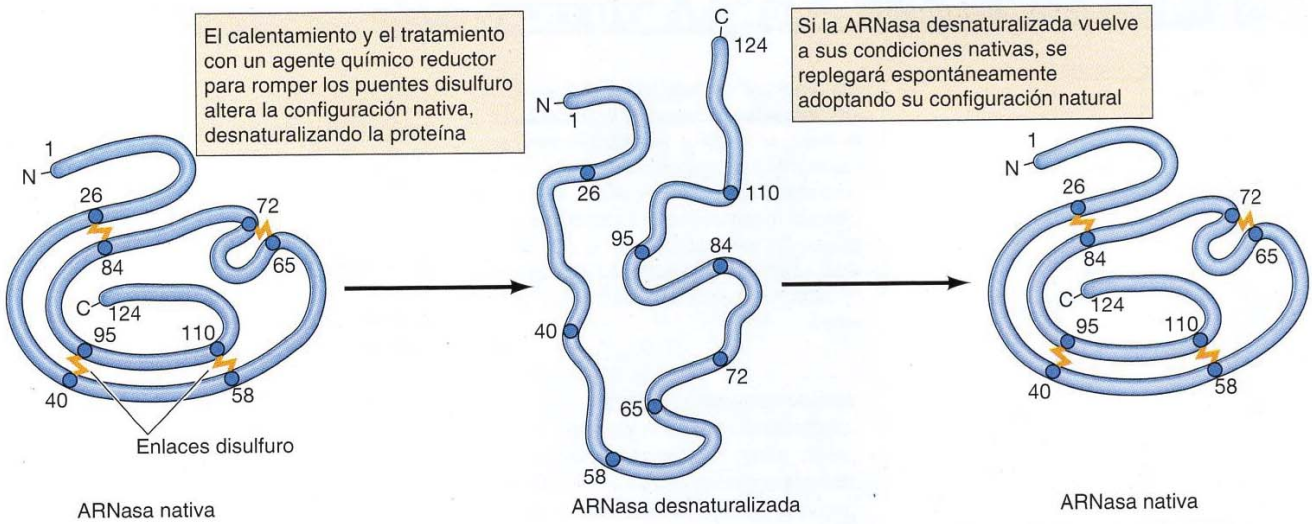


FIGURA 2.17 Desnaturalización y replegamiento proteico. La ribonucleasa (ARNasa) es una proteína de 124 aminoácidos (indicados por números). La proteína normalmente está plegada en su configuración natural, que contiene cuatro enlaces disulfuro (indicados como círculos pareados que representan residuos de cisteína).

rimentos de Christian Anfinsen en los que alteró la estructura tridimensional de las proteínas mediante tratamientos tales como el calentamiento, que rompen los enlaces no covalentes —un proceso denominado desnaturalización (**Fig. 2.17**)—. Después de la incubación en condiciones más favorables, dichas proteínas desnaturalizadas con frecuencia regresan espontáneamente a sus configuraciones nativas, indicando que estas configuraciones están determinadas directamente por la secuencia de aminoácidos.

La estructura tridimensional de las proteínas se analiza con mayor frecuencia por **cristalografía de rayos X**, una técnica de alta resolución que puede determinar el ordenamiento de átomos individuales dentro de una molécula. Se dirige un haz de rayos X a los cristales de la proteína que se desea analizar, y el patrón de rayos X que pasan a través del cristal proteínico se detecta en una película de rayos X. A medida que los rayos X chocan contra el cristal, son dispersados en patrones característicos determinados por el ordenamiento de los átomos en la molécula. La estructura de la molécula puede, por tanto, ser deducida a partir del patrón de rayos X dispersados (el patrón de difracción).

En 1958, John Kendrew fue el primero en determinar la estructura tridimensional de una proteína, la mioglobina —una proteína relativamente simple de 153 aminoácidos (**Fig. 2.18**)—. Desde entonces, más de 90.000 estructuras tridimensionals se han determinado. La mayoría de las proteínas, como la mioglobina, son proteínas globulares con cadenas polipeptídicas plegadas en estructuras compactas, aunque algunas (como las proteínas estructurales de los tejidos conectivos) son largas moléculas fibrosas. El análisis de la estructura tridimensional de estas proteínas ha revelado varios principios básicos que gobiernan el plegamiento proteínico, aunque la estructura proteica es tan compleja que predecir la estructura tridimensional de una proteína directamente a partir de su secuencia de aminoácidos es imposible.

La estructura proteica generalmente se describe en cuatro niveles. La **estructura primaria** de una proteína es la secuencia de aminoácidos de su cadena polipeptídica. La **estructura secundaria** es el ordenamiento regular de aminoácidos dentro de regiones localizadas del polipéptido. Dos tipos de estructura secundaria, que fueron propuestos por primera vez por Linus Pauling y Robert Corey en 1951, son particularmente comunes: la **hélice α** y la **hoja β**. Ambas estructuras secundarias se mantienen por enlaces de hidrógeno entre los grupos CO y NH de los enlaces peptídicos. La hélice α se forma cuando una región de una cadena polipeptídica se enrolla sobre sí misma, con el grupo CO de un enlace peptídico formando un enlace de hidrógeno con el grupo NH de un enlace peptídico situado cuatro residuos

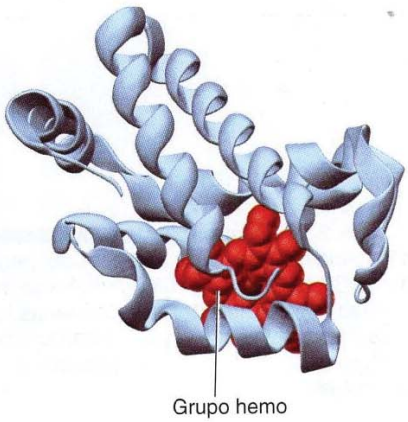


FIGURA 2.18 Estructura tridimensional de la mioglobina. La mioglobina es una proteína de 153 aminoácidos que está implicada en el transporte de oxígeno. La cadena polipeptídica está plegada alrededor del grupo hemo que sirve como lugar de enlace de oxígeno.

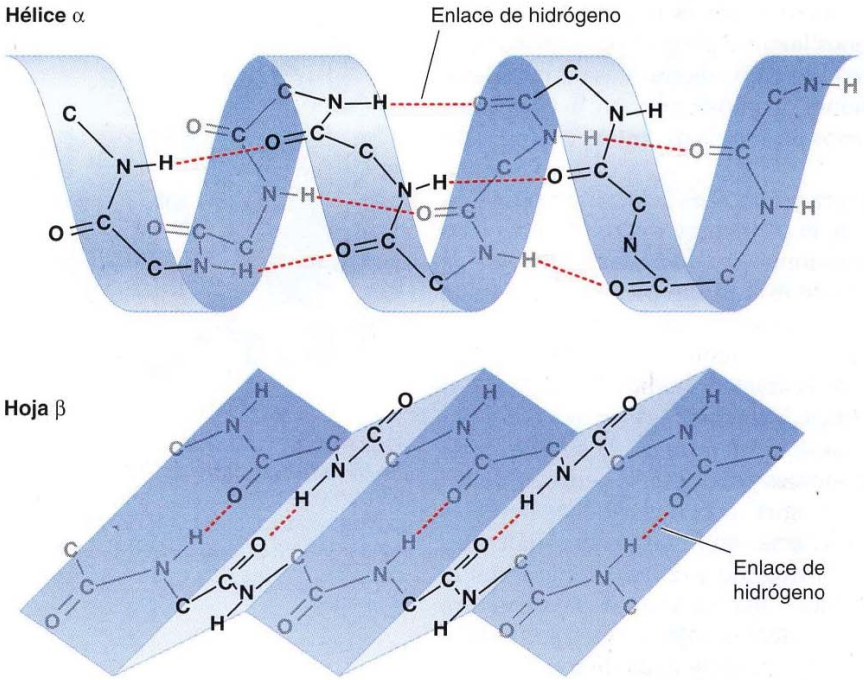


FIGURA 2.19 Estructura secundaria de las proteínas. Los tipos más comunes de estructura secundaria son la hélice α y la hoja β. En la hélice α, los enlaces de hidrógeno se forman entre grupos CO y NH de enlaces peptídicos separados por cuatro residuos de aminoácidos. En la hoja β, los enlaces de hidrógeno conectan dos partes de una cadena polipeptídica que se encuentran una junto a otra. Las cadenas laterales de los aminoácidos no se muestran.

más abajo de la cadena lineal polipeptídica (**Fig. 2.19**). En contraste, la hoja β se forma cuando dos partes de una cadena polipeptídica se encuentran una junto a otra con enlaces de hidrógeno entre ellas. Estas hojas β pueden formarse entre varias hebras polipeptídicas, que pueden estar orientadas bien paralela o antiparalelamente entre sí.

La **estructura terciaria** es el plegamiento global de una cadena polipeptídica debido a las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos situados en distintas regiones de la secuencia primaria. Las unidades básicas de la estructura terciaria se llaman **dominios**, estructuras tridimensionales plegadas que suelen contener entre 50 y 200 aminoácidos (**Fig. 2.20**). En la

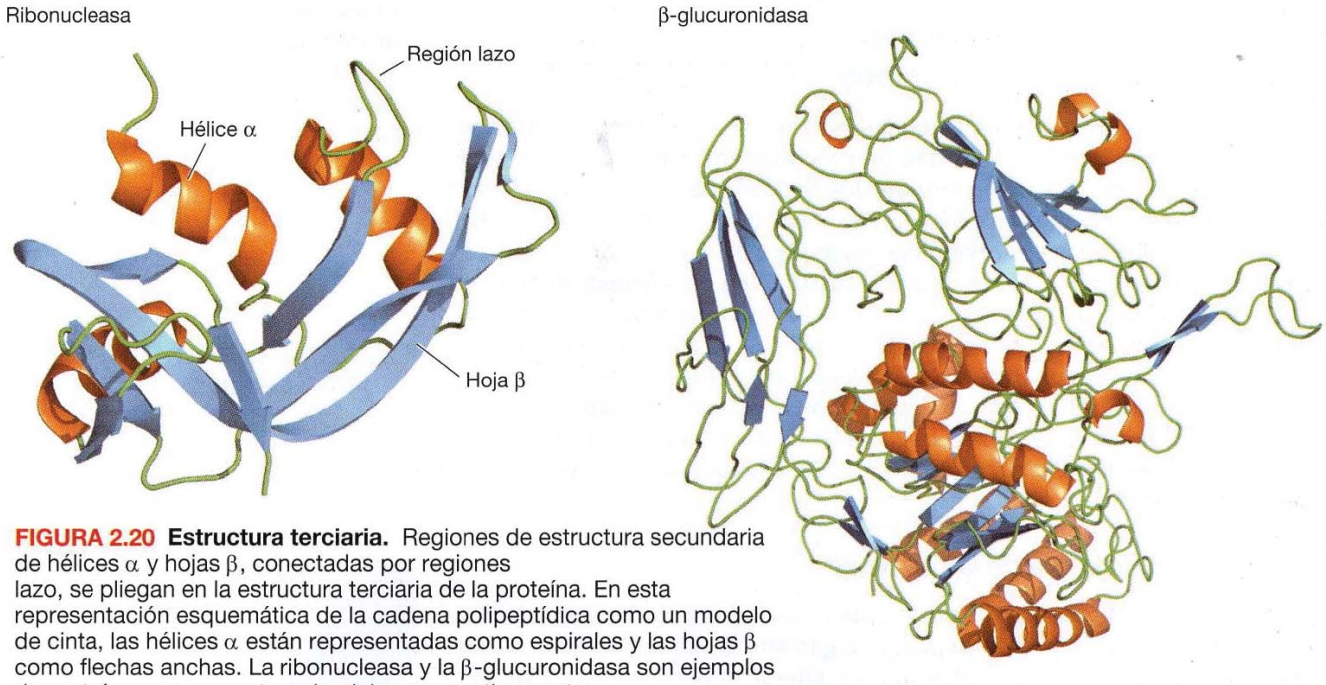


FIGURA 2.20 Estructura terciaria. Regiones de estructura secundaria de hélices α y hojas β, conectadas por regiones lazo, se pliegan en la estructura terciaria de la proteína. En esta representación esquemática de la cadena polipeptídica como un modelo de cinta, las hélices α están representadas como espirales y las hojas β como flechas anchas. La ribonucleasa y la β-glucuronidasa son ejemplos de proteínas con uno y tres dominios, respectivamente.

mayoría de las proteínas, las combinaciones de hélices α y láminas β de la cadena polipeptídica, unidas por regiones lazo, se pliegan para formar dominios globulares. Las proteínas pequeñas, como ribonucleasa o mioglobina, solo contienen un dominio; las proteínas de mayor tamaño, β-glucuronidasa, por ejemplo, pueden contener varios dominios distintos, y a menudo se asocian con funciones diferentes.

Un determinante crucial de la estructura terciaria es la localización de los aminoácidos hidrófobos en el interior de la proteína y de los aminoácidos hidrófilos en la superficie, donde interaccionan con el agua. El interior de las proteínas plegadas está constituido de este modo principalmente de aminoácidos hidrófobos organizados en hélices α y hojas β; estas estructuras secundarias se encuentran en el centro hidrófobo de las proteínas porque los enlaces de hidrógeno neutralizan el carácter polar de los grupos CO y NH de la columna vertebral polipeptídica. Las regiones lazo que conectan los elementos de la estructura secundaria se encuentran en la superficie de las proteínas plegadas, donde los componentes polares de los enlaces peptídicos forman enlaces de hidrógeno con el agua o con las cadenas laterales de los aminoácidos hidrófilos. Las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos polares (enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos) en la superficie proteica son también importantes determinantes de la estructura terciaria. Además, los enlaces disulfuro covalentes entre grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína estabilizan la estructura plegada de muchas proteínas de la superficie celular o de secreción.

El cuarto nivel de la estructura proteica, la **estructura cuaternaria**, consiste en las interacciones entre diferentes cadenas polipeptídicas en proteínas compuestas de más de un polipéptido. La hemoglobina, por ejemplo, está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas por el mismo tipo de interacciones que mantienen la estructura terciaria (**Fig. 2.21**).

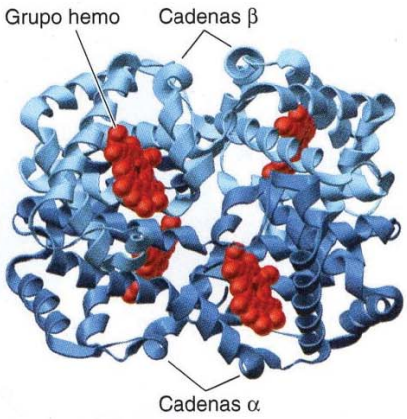


FIGURA 2.21 Estructura cuaternaria de la hemoglobina. La hemoglobina se compone de cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales está ligada a un grupo hemo. Las dos cadenas α y las dos cadenas β son idénticas.

De este modo, las características químicas propias de los 20 aminoácidos distintos conducen a una variación considerable en la configuración tridimensional de las proteínas plegadas. En consecuencia, las proteínas constituyen un grupo extremadamente complejo y variado de macromoléculas, adaptadas a la gran variedad de tareas que llevan a cabo en la biología celular.

Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos

Una tarea fundamental de las proteínas es actuar como enzimas —catalizadores que incrementan la velocidad de prácticamente todas las reacciones químicas dentro de la célula—. Aunque los ARN son capaces de catalizar algunas reacciones, la mayoría de las reacciones biológicas son catalizadas por proteínas. En ausencia de catálisis enzimática, la mayoría de las reacciones bioquímicas son tan lentas que no ocurrirían en condiciones de temperatura y presión compatibles con la vida. Las enzimas aceleran la velocidad de estas reacciones muy por encima de un millón de veces, de tal forma que reacciones que tardarían años en la ausencia de catálisis pueden ocurrir en fracciones de segundos si son catalizadas por la enzima adecuada. Las células contienen miles de enzimas diferentes, y su actividad determina cuáles de las múltiples reacciones químicas posibles tienen lugar en la práctica dentro de la célula.

◆ Las enzimas son unos catalizadores increíbles. Algunas enzimas son capaces de incrementar la tasa de una reacción tanto como 10^{18} veces en comparación con una reacción sin catalizar, de modo que un proceso que normalmente tardaría billones de años puede tener lugar en menos de un segundo.

Actividad catalizadora de las enzimas

Como todos los demás catalizadores, las **enzimas** se caracterizan por dos propiedades fundamentales. En primer lugar, aumentan la velocidad de las reacciones químicas sin ser consumidas o alteradas permanentemente por

ANIMACIÓN 2.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a2.2

Catalizadores y activación de la energía. En una reacción química, una enzima disminuye la cantidad de energía necesaria para alcanzar el estado de transición, permitiendo que la reacción tenga lugar a una velocidad acelerada.

la reacción. En segundo lugar, aumentan la velocidad de las reacciones sin alterar el equilibrio químico entre sustratos y productos.

Estos principios de catálisis enzimática se ilustran en el siguiente ejemplo, en el que una molécula sobre la que actúa un enzima (denominada **sustrato** [*S*]) se convierte en un **producto** (*P*) como resultado de la reacción. En ausencia de enzima, la reacción puede escribirse como sigue:

$$S \rightleftharpoons P$$

El equilibrio químico entre *S* y *P* depende de las leyes de la termodinámica (como se trata más adelante en la siguiente sección de este capítulo) y se representa como la razón de las velocidades de las reacciones directa e inversa ($S \rightarrow P$ y $P \rightarrow S$, respectivamente). En presencia de la enzima apropiada, la conversión de *S* a *P* se acelera, pero el equilibrio entre *S* y *P* no se altera. Por lo tanto, la enzima debería acelerar las reacciones directa e inversa igualmente. La reacción puede escribirse como sigue:

$$S \overset{E}{\rightleftharpoons} P$$

Obsérvese que la enzima (*E*) no se altera por la reacción, así que el equilibrio químico se mantiene inalterado, determinado tan sólo por las propiedades termodinámicas de *S* y *P*.

El efecto de la enzima en una reacción como esta se ilustra mejor por los cambios energéticos que deben ocurrir durante la conversión de *S* a *P* (**Fig. 2.22**). El equilibrio de la reacción viene determinado por el estado energético final de *S* y *P*, que no están afectados por la catálisis enzimática. Para que la reacción enzimática pueda producirse, sin embargo, el sustrato debe convertirse primero a un estado de mayor energía, denominado **estado de transición**. La energía necesaria para alcanzar el estado de transición (la **energía de activación**) constituye una barrera para el desarrollo de la reacción, limitando la velocidad de la reacción. Las enzimas (y otros catalizadores) actúan reduciendo la energía de activación, incrementando de este modo la velocidad de la reacción. El incremento de velocidad es el mismo, tanto en la dirección directa como en la inversa, ya que ambas deben pasar por el mismo estado de transición.

La actividad catalítica de las enzimas implica su unión a los sustratos para formar un complejo enzima-sustrato (*ES*). El sustrato se une a una región específica de la enzima, denominada **lugar activo**. Mientras está ligado al lugar activo, el sustrato se convierte en el producto de la reacción, que entonces se separa de la enzima. La reacción catalizada por enzimas puede, por tanto, escribirse como sigue:

$$S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$

Obsérvese que *E* aparece inalterada en ambos lados de la ecuación, así que el equilibrio no se afecta. Sin embargo, la enzima proporciona una superficie sobre la que las reacciones que convierten *S* en *P* pueden tener lugar más fácilmente. Esto es el resultado de las interacciones entre la enzima y sustrato que disminuyen la energía de activación y favorecen la formación del estado de transición.

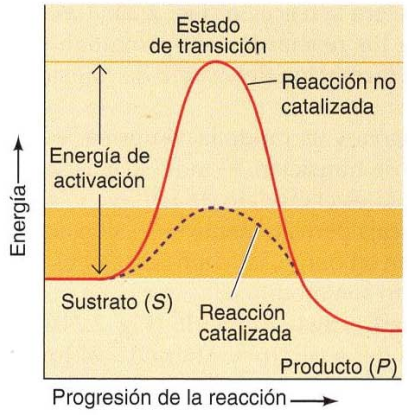


FIGURA 2.22 Reacciones catalizadas y no catalizadas. La reacción ilustrada es la conversión simple de un sustrato *S* a un producto *P*. Debido a que el estado final de energía de *P* es menor que el de *S*, la reacción progresa de izquierda a derecha. Para que la reacción tenga lugar, sin embargo, *S* debe pasar primero por un estado de transición de mayor energía. La energía requerida para alcanzar este estado de transición (la energía de activación) representa una barrera al desarrollo de la reacción y, por tanto, determina la velocidad a la que la reacción avanza. Sin embargo, en presencia de un catalizador (p. ej., una enzima), la energía de activación disminuye y la reacción se produce a una velocidad acelerada.

Mecanismos de catálisis enzimática

La unión del sustrato al sitio activo de una enzima es una interacción muy específica. Los lugares activos son grietas o hendiduras en la superficie de una enzima, habitualmente compuestas de aminoácidos de diferentes partes de la cadena polipeptídica que se aproximan con la estructura terciaria de la proteína plegada. Los sustratos se ligan inicialmente al lugar activo mediante interacciones no covalentes, incluyendo enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrófobas. Una vez que el sustrato está unido

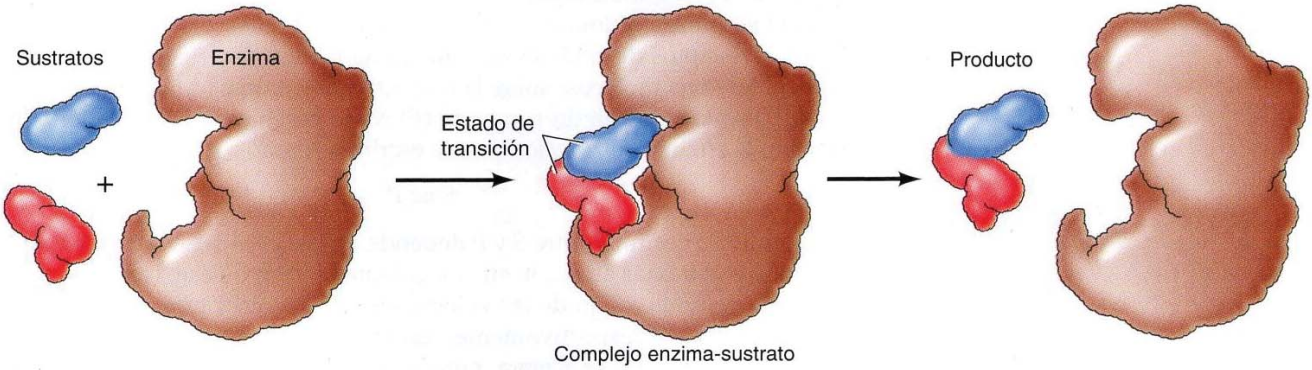


FIGURA 2.23 Catálisis enzimática de una reacción entre dos sustratos. La enzima proporciona un molde sobre el que los reactantes se aproximan en la posición y orientación adecuada para reaccionar entre sí.

ANIMACIÓN 2.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a2.3

Reacciones catalizadas por enzimas. En este ejemplo, una enzima proporciona un molde sobre el que dos sustratos entran en contacto en la posición y orientación adecuada para poder reaccionar entre sí.

al lugar activo de una enzima, múltiples mecanismos pueden acelerar su conversión en el producto de la reacción.

Aunque este sencillo ejemplo tratado en la sección anterior implicaba una única molécula de sustrato, la mayoría de las reacciones bioquímicas implican interacciones entre dos o más sustratos diferentes. Por ejemplo, la formación de un enlace peptídico implica la unión de dos aminoácidos. Para reacciones como esta, la unión de dos o más sustratos al lugar activo en la posición y orientación adecuada acelera la reacción (**Fig. 2.23**). La enzima proporciona un molde sobre el que los reactantes se aproximan y se orientan correctamente para favorecer la formación del estado de transición en el que interactúan.

Las enzimas también aceleran las reacciones alterando la conformación de sus sustratos para acercarse al del estado de transición. El modelo más sencillo de interacción enzima-sustrato es el **modelo de la llave y la cerradura**, en el que el sustrato encaja perfectamente en el sitio activo (**Fig. 2.24A**). En muchos casos, sin embargo, las configuraciones tanto de la enzima como del sustrato son modificadas por la unión del sustrato —un proceso denominado **ajuste inducido** (**Fig. 2.24B**)—. En estos casos la conformación del sustrato se altera de tal forma que se asemeja más a la del estado de transición. El estrés producido por esta distorsión en el sustrato puede facilitar aún más su conversión hasta alcanzar el estado de transición debilitando enlaces cruciales. Además, el estado de transición se estabiliza por su estrecha unión a la enzima, disminuyendo de este modo la energía de activación requerida.

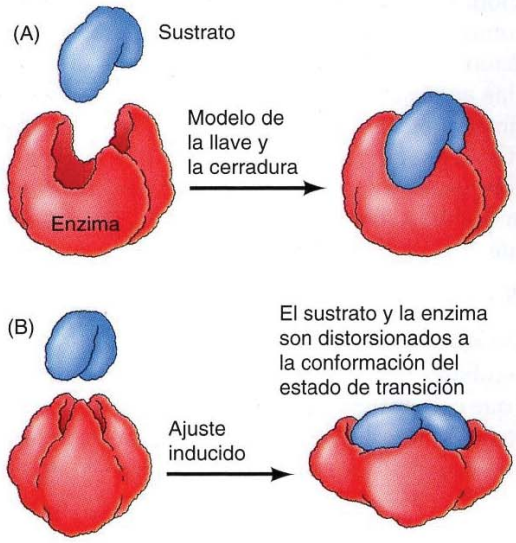
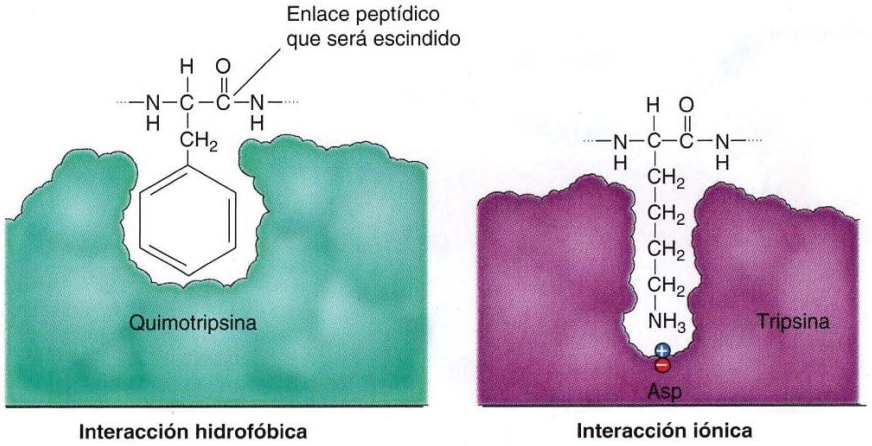


FIGURA 2.24 Modelos de la interacción enzima-sustrato. (A) En el modelo de la llave y la cerradura, el sustrato encaja perfectamente en el sitio activo de la enzima. (B) En el modelo de ajuste inducido, la unión del sustrato distorsiona las conformaciones tanto de la enzima como del sustrato. Esta distorsión aproxima al sustrato a la conformación del estado de transición, acelerando de este modo la reacción.

Aparte de reunir múltiples sustratos y distorsionar la conformación de los sustratos para aproximarlos al estado de transición, muchas enzimas participan directamente en el proceso catalítico. En estos casos, las cadenas laterales específicas de aminoácidos en el sitio activo pueden reaccionar con el sustrato y formar enlaces con intermediarios de la reacción. Los aminoácidos ácidos y básicos están frecuentemente implicados en estos mecanismos catalíticos, como se demuestra en la siguiente discusión sobre la quimotripsina como un ejemplo de catálisis enzimática.

La quimotripsina es miembro de una familia de enzimas (las serín proteasas) que digieren las proteínas catalizando la hidrólisis de los enlaces peptídicos. La reacción puede escribirse como sigue:

$$\text{Proteína} + H_2O \rightarrow \text{Péptido}_1 + \text{Péptido}_2$$



Interacción hidrofóbica

Interacción iónica

FIGURA 2.25 Ligamiento del sustrato por las serín proteasas. El aminoácido adyacente al enlace peptídico que será roto se inserta en un «bolsillo» en el sitio activo de la enzima. En la quimotripsina, el bolsillo liga aminoácidos hidrófobos; el bolsillo de unión de la tripsina contiene un residuo de aspartato cargado negativamente que liga aminoácidos básicos mediante una interacción iónica.

Los diferentes miembros de la familia de las serín proteasas (incluyendo quimotripsina, tripsina, elastasa y trombina) tienen especificidades de sustrato características; rompen preferentemente enlaces peptídicos adyacentes a diferentes aminoácidos. Por ejemplo, mientras que la quimotripsina digiere enlaces adyacentes a aminoácidos hidrófobos, como el triptófano y la fenilalanina, la tripsina digiere enlaces junto a aminoácidos básicos, como la lisina y la arginina. Todas las serín proteasas, sin embargo, son similares en estructura y emplean el mismo mecanismo de catálisis. Los sitios activos de estas enzimas contienen tres aminoácidos cruciales —serina, histidina y aspartato— que conducen la hidrólisis del enlace peptídico. En verdad, estas enzimas se denominan serín proteasas debido al papel central del residuo de serina.

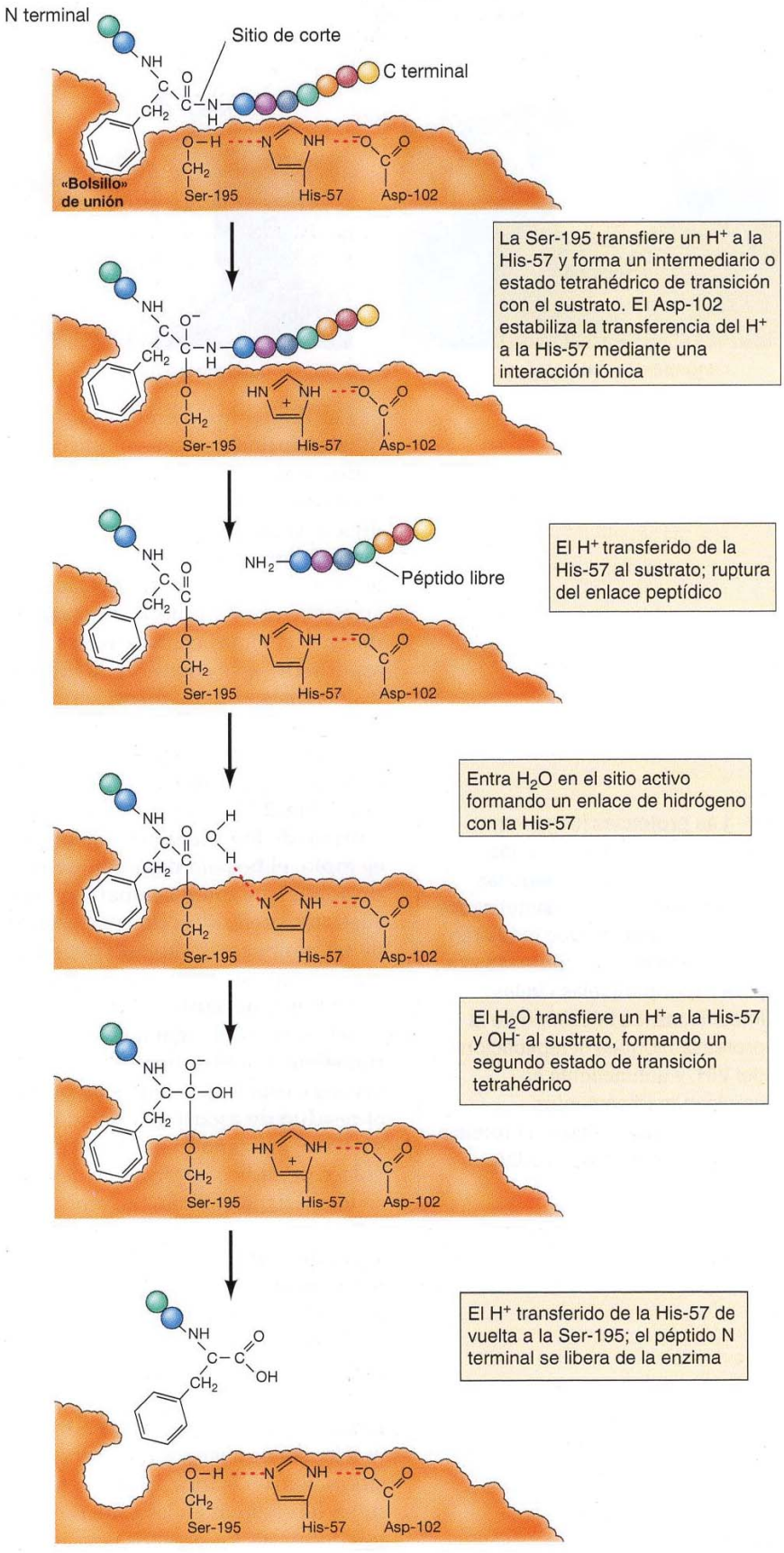
Los sustratos se ligan a las serín proteasas mediante la inserción del aminoácido adyacente al sitio de corte en un bolsillo en el lugar activo de la enzima (**Fig. 2.25**). La naturaleza de este bolsillo determina la especificidad de sustrato de los diferentes miembros de la familia de las serín proteasas. Por ejemplo, el bolsillo de unión de la quimotripsina contiene aminoácidos hidrófobos que interaccionan con las cadenas laterales hidrofóbicas de sus sustratos preferidos. En contraste, el bolsillo de unión de la tripsina contiene un aminoácido cargado negativamente (aspartato), que es capaz de formar un enlace iónico con residuos de arginina o de lisina de sus sustratos.

La unión del sustrato sitúa al enlace peptídico para ser desdoblado cercano a la serina del lugar activo (**Fig. 2.26**). El protón de esta serina entonces se transfiere a la histidina del lugar activo. La conformación del lugar activo favorece esta transferencia de protones porque la histidina interacciona con el residuo de aspartato cargado negativamente. La serina reacciona con el sustrato, formando un intermediario o estado de transición tetrahédrico. El enlace peptídico entonces se desdobla, y la porción C-terminal del sustrato se libera de la enzima. Sin embargo, el péptido N-terminal permanece unido a la serina. Esta situación se resuelve cuando una molécula de agua (el segundo sustrato) entra en el sitio activo y revierte las reacciones precedentes. El protón de la molécula de agua se transfiere a la histidina, y su grupo hidroxilo al péptido, formando un segundo estado de transición tetrahédrico. El protón se transfiere entonces de la histidina de vuelta a la serina, y el péptido se libera de la enzima, completando la reacción.

Este ejemplo ilustra diversos aspectos de la catálisis enzimática: la especificidad de las interacciones enzima-sustrato, la colocación de las distintas moléculas de sustrato en el sitio activo, y la implicación de los residuos del sitio activo en la formación y estabilización del estado de transición. Aunque miles de enzimas en las células catalizan muchos diferentes tipos de reacciones químicas, los mismos principios básicos se aplican a su funcionamiento.

◆ Las proteasas juegan una diversidad de papeles en las células y en los virus. Algunas proteínas del VIH son sintetizadas como precursores que requieren su escisión por una proteasa viral para hacer partículas virales infecciosas. La inhibición de la proteasa bloquea la replicación del VIH, y actualmente se emplean medicamentos diseñados para inhibir la proteasa para el tratamiento del SIDA (véase Cap. 9).

FIGURA 2.26 Mecanismo catalítico de la quimiotripsina. Tres aminoácidos en el sitio activo (Ser-195, His-57 y Asp-102) desempeñan papeles cruciales en la catálisis.



Coenzimas

Además de unir a sus sustratos, los lugares activos de muchas enzimas ligan otras pequeñas moléculas que participan en la catálisis. Los **grupos prostéticos** son pequeñas moléculas unidas a proteínas en las que desempeñan papeles cruciales. Por ejemplo, el oxígeno transportado por la mioglobina y la hemoglobina está unido al hemo, un grupo prostético de estas proteínas. En muchos casos iones metálicos (como el cinc o el hierro) están unidos a enzimas y desempeñan papeles centrales en el proceso catalítico. Además, varias moléculas orgánicas de bajo peso molecular participan en tipos específicos de reacciones enzimáticas. Estas moléculas se denominan **coenzimas** porque trabajan junto con las enzimas para aumentar la velocidad de reacción. A diferencia de los sustratos, las coenzimas no se alteran de forma irreversible por las reacciones en las que participan, más bien se reciclan y pueden participar en múltiples reacciones enzimáticas.

Las coenzimas sirven como transportadores de distintos tipos de grupos químicos. Un ejemplo importante de una coenzima es el **nicotinamín adenín dinucleótido (NAD^+),** que funciona como transportador de electrones en reacciones de óxido-reducción (**Fig. 2.27**). El NAD^+ puede aceptar un ión

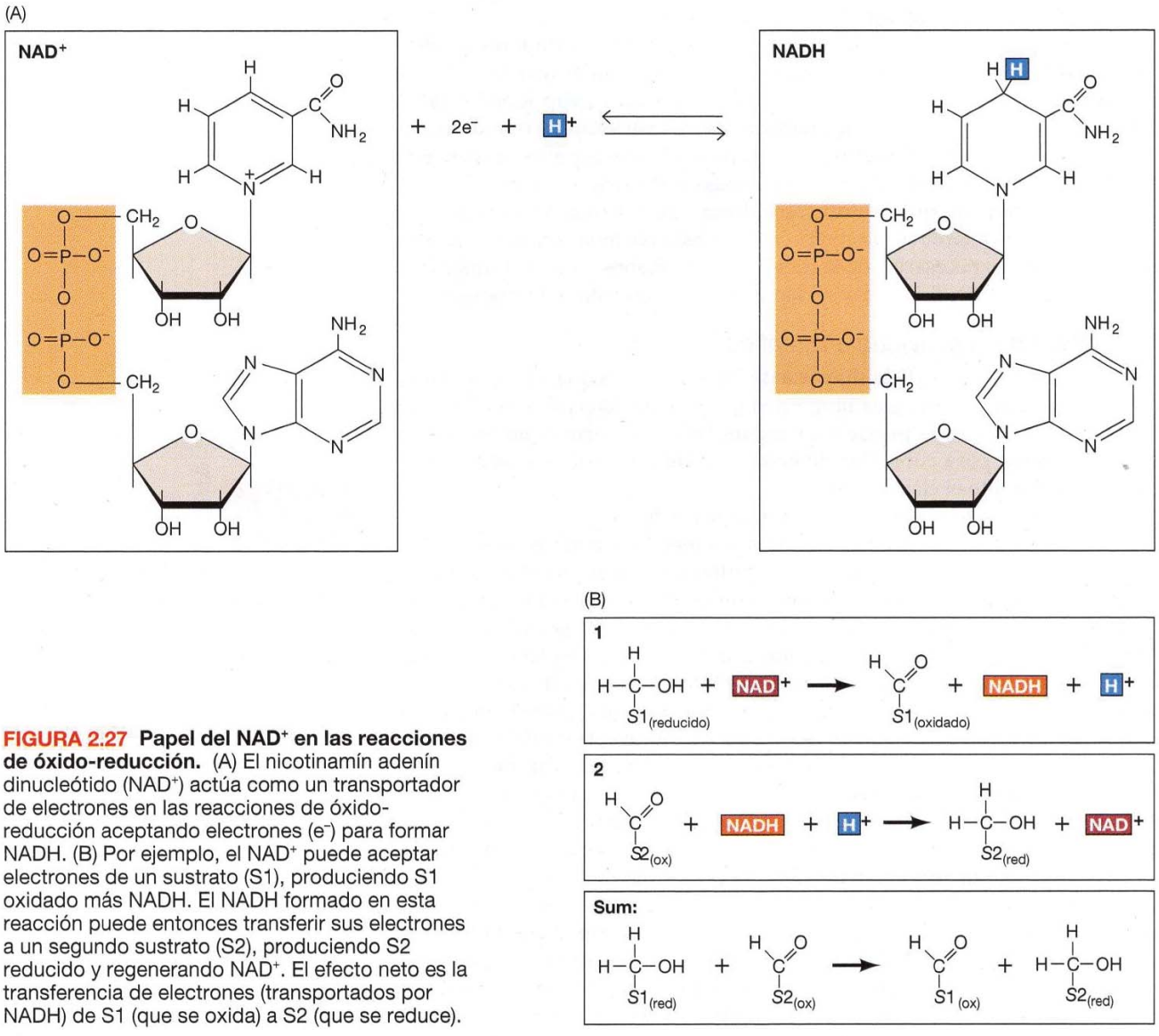


FIGURA 2.27 Papel del NAD^+ en las reacciones de óxido-reducción. (A) El nicotinamín adenín dinucleótido (NAD^+) actúa como un transportador de electrones en las reacciones de óxido-reducción aceptando electrones (e^-) para formar NADH. (B) Por ejemplo, el NAD^+ puede aceptar electrones de un sustrato (S1), produciendo S1 oxidado más NADH. El NADH formado en esta reacción puede entonces transferir sus electrones a un segundo sustrato (S2), produciendo S2 reducido y regenerando NAD^+. El efecto neto es la transferencia de electrones (transportados por NADH) de S1 (que se oxida) a S2 (que se reduce).

TABLA 2.1 Ejemplos de coenzimas y vitaminas

Coenzima	Vitamina relacionada	Reacción química
NAD^+, $NADP^+$	Niacina	Óxido-reducción
FAD	Riboflavina (B_2)	Óxido-reducción
Tiamina pirofosfato	Tiamina (B_1)	Transferencia de grupos aldehído
Coenzima A	Pantoténico	Transferencia de grupos acilo
Tetrahidrofolato	Folato	Transferencia de grupos metilo
Piridoxal fosfato	Piridoxal (B_6)	Transaminación
Biotina	Biotina	Carboxilación y transferencia de grupos carboxilo

de hidrógeno (H^+) y dos electrones (e^-) de un sustrato, formando NADH. El NADH puede entonces donar estos electrones a un segundo sustrato, reformando el NAD^+. De este modo, el NAD^+ transfiere electrones del primer sustrato (que se oxida) al segundo (que se reduce).

Otras coenzimas diversas también actúan como transportadores de electrones, e incluso otras están implicadas en la transferencia de una variedad de grupos químicos adicionales (p. ej., grupos carboxilo y grupos acilo; **Tabla 2.1**). Las mismas coenzimas funcionan junto a una variedad de diferentes enzimas para catalizar la transferencia de grupos químicos específicos entre una amplia gama de sustratos. Muchas coenzimas están estrechamente relacionadas con las vitaminas, que contribuyen a formar parte o toda la estructura de la coenzima. Las vitaminas no son necesarias para bacterias como *E. coli* pero son componentes necesarios de la dieta de los humanos y otros animales superiores, que han perdido la capacidad para sintetizar estos compuestos.

Regulación de la actividad enzimática

Un aspecto importante de la mayoría de las enzimas es que sus actividades no son constantes, pero en cambio pueden ser moduladas. Esto es, las actividades de las enzimas pueden ser reguladas de tal forma que funcionan adecuadamente para cubrir las diversas necesidades fisiológicas que pueden surgir durante el ciclo celular.

Un tipo frecuente de regulación enzimática es la **inhibición por retroalimentación**, en la que el producto de una vía metabólica inhibe la actividad de una de las enzimas implicadas en su síntesis. Por ejemplo, el aminoácido isoleucina se sintetiza a través de una serie de reacciones comenzando por el aminoácido treonina (**Fig. 2.28**). El primer paso de la vía está catalizado por la enzima treonina deaminasa, que es inhibida por la isoleucina, el producto final de la vía. De este modo, una cantidad adecuada de isoleucina en la célula inhibe la treonina desaminasa, bloqueando una síntesis mayor de isoleucina. Si la concentración de isoleucina disminuye, la inhibición por retroalimentación disminuye, la treonina desaminasa ya no se inhibe, y se sintetiza isoleucina adicional. Regulando de este modo la actividad de la treonina desaminasa, la célula sintetiza la cantidad necesaria de isoleucina pero evita desperdiciar energía en la síntesis de más isoleucina de la necesaria.

La inhibición por retroalimentación es un ejemplo de la **regulación alostérica**, en la que la actividad enzimática se controla por la unión de moléculas pequeñas a los lugares reguladores de la enzima (**Fig. 2.29**). El término «regulación alostérica» deriva del hecho de que las moléculas reguladoras no se unen al sitio catalítico, sino a un sitio específico en la proteína (*allo* = «otro» y *steric* = «sitio»). La unión de la molécula reguladora cambia

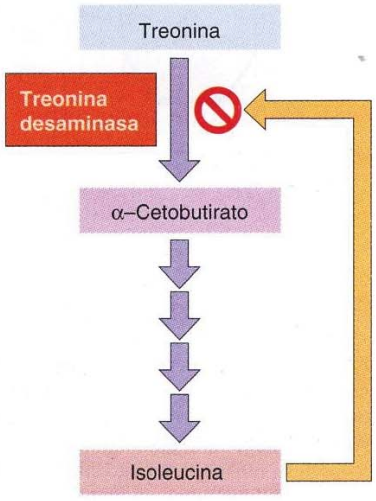


FIGURA 2.28 Inhibición por retroalimentación. El primer paso en la conversión de treonina a isoleucina es catalizado por la enzima treonina desaminasa. La actividad de esta enzima está inhibida por la isoleucina, el producto final de la vía.

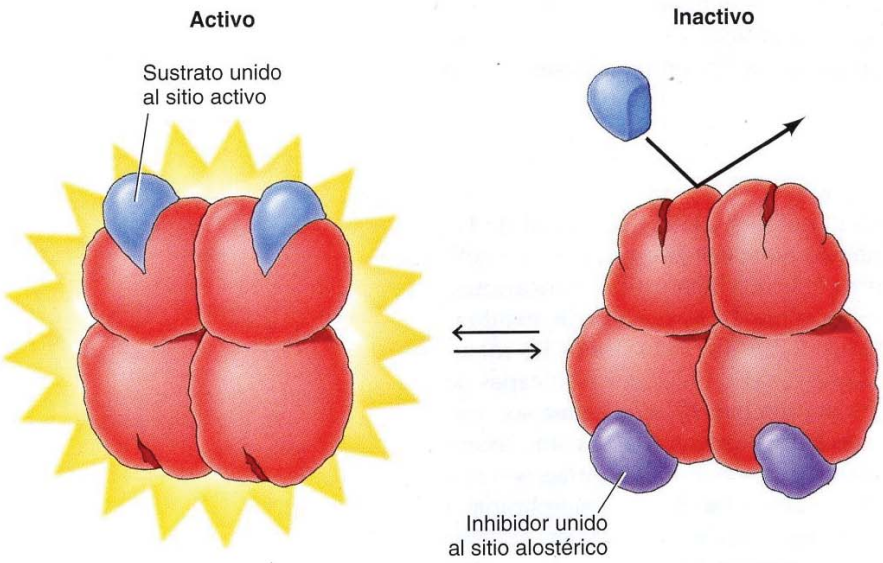


FIGURA 2.29 Regulación alostérica. En este ejemplo, la actividad enzimática es inhibida por la unión de una molécula reguladora a un sitio alostérico. En ausencia del inhibidor, el sustrato se une al sitio activo de la enzima y la reacción progresa. La unión del inhibidor al sitio alostérico induce un cambio conformacional en la enzima e impide la unión del sustrato. La mayoría de las enzimas alostéricas constan de múltiples subunidades.

la conformación de la proteína, lo que a su vez altera la forma del sitio activo y la actividad catalítica de la enzima. En el caso de la treonina desaminasa, el ligamiento de la molécula reguladora (isoleucina) inhibe la actividad enzimática. En otros casos las moléculas reguladoras actúan como activadores, estimulando en vez de inhibir sus enzimas diana.

Las actividades de las enzimas también pueden ser reguladas por sus interacciones con otras proteínas y por modificaciones covalentes, como la adición de grupos fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina. La **fosforilación** es un mecanismo especialmente frecuente para regular la actividad enzimática; la adición de grupos fosfato puede estimular o inhibir las actividades de muchas enzimas diferentes (**Fig. 2.30**). Por ejemplo, las células musculares responden a la epinefrina (adrenalina) degradando el glucógeno a glucosa, proporcionando de este modo una fuente de energía para una actividad muscular aumentada. La degradación del glucógeno es catalizada por la enzima glucógeno fosforilasa, que se activa por la fosforilación en respuesta a la unión de la epinefrina a un receptor en la superficie de la

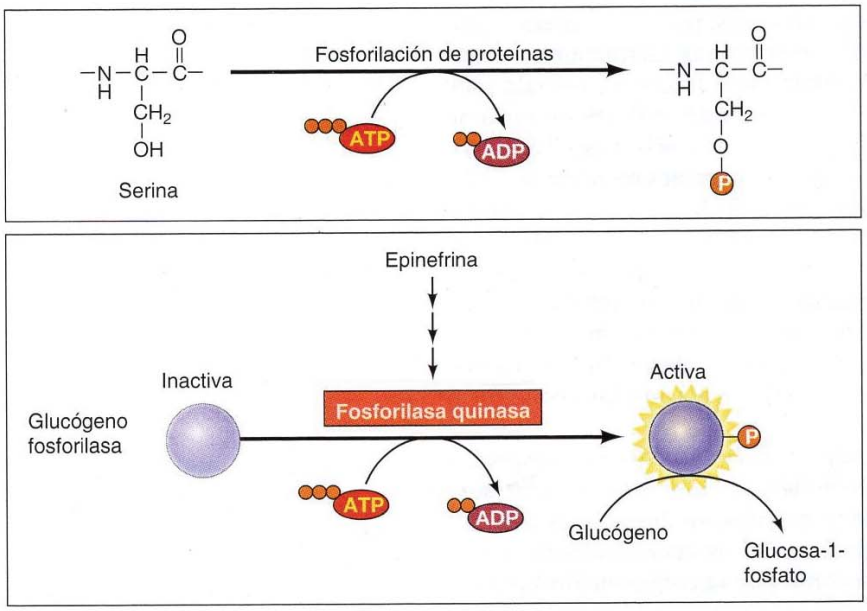


FIGURA 2.30 Fosforilación de proteínas. Algunas enzimas están reguladas por la adición de grupos fosfato a los grupos OH de las cadenas laterales de residuos de serina (como se muestra aquí), treonina o tirosina. Por ejemplo, la enzima glucógeno fosforilasa, que cataliza la conversión del glucógeno a glucosa-1-fosfato, es activada por fosforilación en respuesta a la unión de epinefrina a las células musculares.

célula muscular. La fosforilación de proteínas desempeña un papel central en el control no sólo de las reacciones metabólicas sino también de muchas otras funciones celulares, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular.

Membranas celulares

La estructura y función de las células dependen de forma crucial de las membranas, que no sólo separan el interior de la célula de su entorno sino que también definen los compartimentos internos de las células eucariotas, incluyendo las organelas de núcleo y citoplasma. La formación de membranas biológicas se basa en las propiedades de los lípidos, y todas las membranas celulares comparten una misma organización estructural: bicapas de fosfolípidos con proteínas asociadas. Estas proteínas de membrana son responsables de muchas funciones especializadas; algunas actúan como receptores que permiten a la célula responder a señales externas, algunas son responsables del transporte selectivo de moléculas a través de la membrana, y otras participan en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. Además, las proteínas de membrana controlan las interacciones entre células de organismos pluricelulares. La organización estructural común de las membranas subyace de este modo en una gran variedad de procesos biológicos y funciones especializadas de membrana, que se tratarán con detalle en otros capítulos.

Lípidos de membrana

Los bloques de construcción fundamentales de todas las membranas celulares son los fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas, que consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos ligadas a un grupo de cabeza hidrófilo que contiene fosfato (véase Fig. 2.7). Debido a que sus colas de ácidos grasos son escasamente solubles en agua, los fosfolípidos forman bicapas espontáneamente en soluciones acuosas, con las colas hidrófobas enterradas en el interior de la membrana y los grupos polares de cabeza expuestos en ambos lados, en contacto con el agua (**Fig. 2.31**). Dichas **bicapas fosfolipídicas** forman una barrera estable entre dos compartimentos acuosos y representan la estructura básica de todas las membranas biológicas.

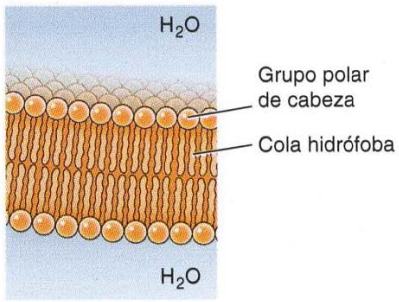


FIGURA 2.31 Bicapa fosfolipídica. Los fosfolípidos forman espontáneamente bicapas estables, con sus grupos polares de cabeza expuestos al agua y sus colas hidrófobas enterradas en el interior de la membrana.

Los lípidos constituyen aproximadamente el 50% de la masa de la mayoría de las membranas celulares, aunque esta proporción varía dependiendo del tipo de membrana. Las membranas plasmáticas, por ejemplo, son aproximadamente un 50% de lípidos y un 50% de proteínas. La membrana interna de la mitocondria, por otra parte, contiene una fracción inusualmente alta (aproximadamente el 75 %) de proteínas, reflejando la abundancia de complejos proteínicos implicados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. La composición lipídica de las diferentes membranas celulares también varía. La membrana plasmática de *E. coli* contiene predominantemente fosfatidiletanolamina. Las membranas plasmáticas de los animales son más complejas, conteniendo cinco fosfolípidos principales —fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y esfingomielina. Además de los fosfolípidos, la membrana plasmática de las células animales contiene glucolípidos (que tienen cabezas hidrocarbonadas) y colesterol, que generalmente corresponden a aproximadamente el 40% de las moléculas de lípidos totales.

Una importante propiedad de las bicapas lipídicas es que se comportan como fluidos bidimensionales en los que moléculas individuales (tanto lípidos como proteínas) son libres para rotar y moverse en direcciones laterales (**Fig. 2.32**). Esta fluidez es una propiedad crucial de las membranas y está determinada tanto por la temperatura como por la composición lipídica.

◆ ¿Cómo perciben las plantas el frío? Las evidencias sugieren que las plantas detectan caídas de temperatura en parte detectando variaciones en la fluidez de sus membranas.

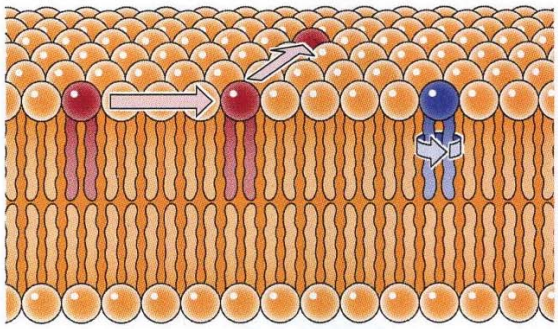


FIGURA 2.32 Movilidad de los fosfolípidos en una membrana. Fosfolípidos individuales pueden rotar y moverse lateralmente dentro de una bicapa.

VÍDEO 2.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v2.2

Efecto de ordenación del colesterol en la bicapa de lípidos. Las moléculas de colesterol de una membrana celular influyen en la distribución de los fosfolípidos en la bicapa.

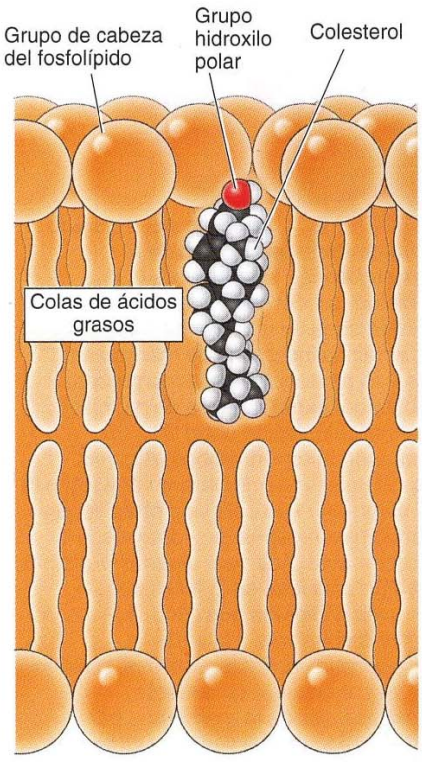


FIGURA 2.33 Inserción de colesterol en una membrana. El colesterol se inserta en la membrana con su grupo hidroxilo polar próximo a los grupos polares de cabeza de los fosfolípidos.

Por ejemplo, las interacciones entre cadenas más cortas de ácidos grasos son más débiles que aquellas entre cadenas más largas, así que las membranas que contienen cadenas de ácidos grasos más cortas son menos rígidas y se mantienen fluidas a temperaturas más bajas. Los lípidos que contienen ácidos grasos insaturados incrementan de forma similar la fluidez de la membrana porque la presencia de dobles enlaces introduce curvamientos en las cadenas de ácidos grasos, haciendo más difícil que se empaqueten juntas.

Debido a su estructura de anillo hidrocarbonado (véase Fig. 2.9), el colesterol desempeña un papel importante en la determinación de la fluidez de la membrana. Las moléculas de colesterol se insertan en la bicapa con sus grupos polares hidroxilo próximos a los grupos de cabeza hidrofílicos de los fosfolípidos (**Fig. 2.33**). Los anillos hidrocarbonados rígidos del colesterol interactúan, por tanto, con las regiones de las cadenas de ácidos grasos que son adyacentes a los grupos de cabeza de los fosfolípidos. Esta interacción disminuye la movilidad de las porciones externas de las cadenas de ácidos grasos, haciendo que esta parte de la membrana sea más rígida. Por otra parte, la inserción del colesterol interfiere con las interacciones entre cadenas de ácidos grasos, manteniendo de este modo la fluidez de la membrana a temperaturas más bajas.

Proteínas de membrana

Las proteínas son los otros constituyentes principales de las membranas celulares, constituyendo entre el 25% y el 75% de la masa de las diversas membranas de la célula. El modelo actual de la estructura de la membrana, propuesto por Jonathan Singer y Garth Nicolson en 1972, considera las membranas como un **mosaico fluido** en el que las proteínas están insertadas en una bicapa lipídica (**Fig. 2.34**). Mientras los fosfolípidos proporcionan la estructura fundamental de las membranas, las proteínas de membrana desempeñan las funciones específicas de las diferentes membranas de la célula. Estas proteínas se dividen en dos tipos generales, basándose en la naturaleza de su asociación con la membrana. Las **proteínas integrales de membrana** están embebidas directamente dentro de la bicapa lipídica. Las **proteínas periféricas de membrana** no están insertadas en la bicapa lipídica pero están asociadas con la membrana indirectamente, generalmente a través de interacciones con las proteínas integrales de membrana.

Muchas proteínas integrales de membrana (llamadas **proteínas transmembrana**) atraviesan la bicapa lipídica, con partes expuestas en ambos lados de la membrana. Las partes de estas proteínas que atraviesan la membrana son habitualmente regiones α-helicoidales de entre 20 a 25 aminoácidos no polares. Las cadenas laterales hidrófobas de estos aminoácidos interaccionan con las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de membrana, y la formación de una α-hélice neutraliza el carácter polar de los enlaces peptídicos, como se discute previamente en este capítulo con respecto al plega-

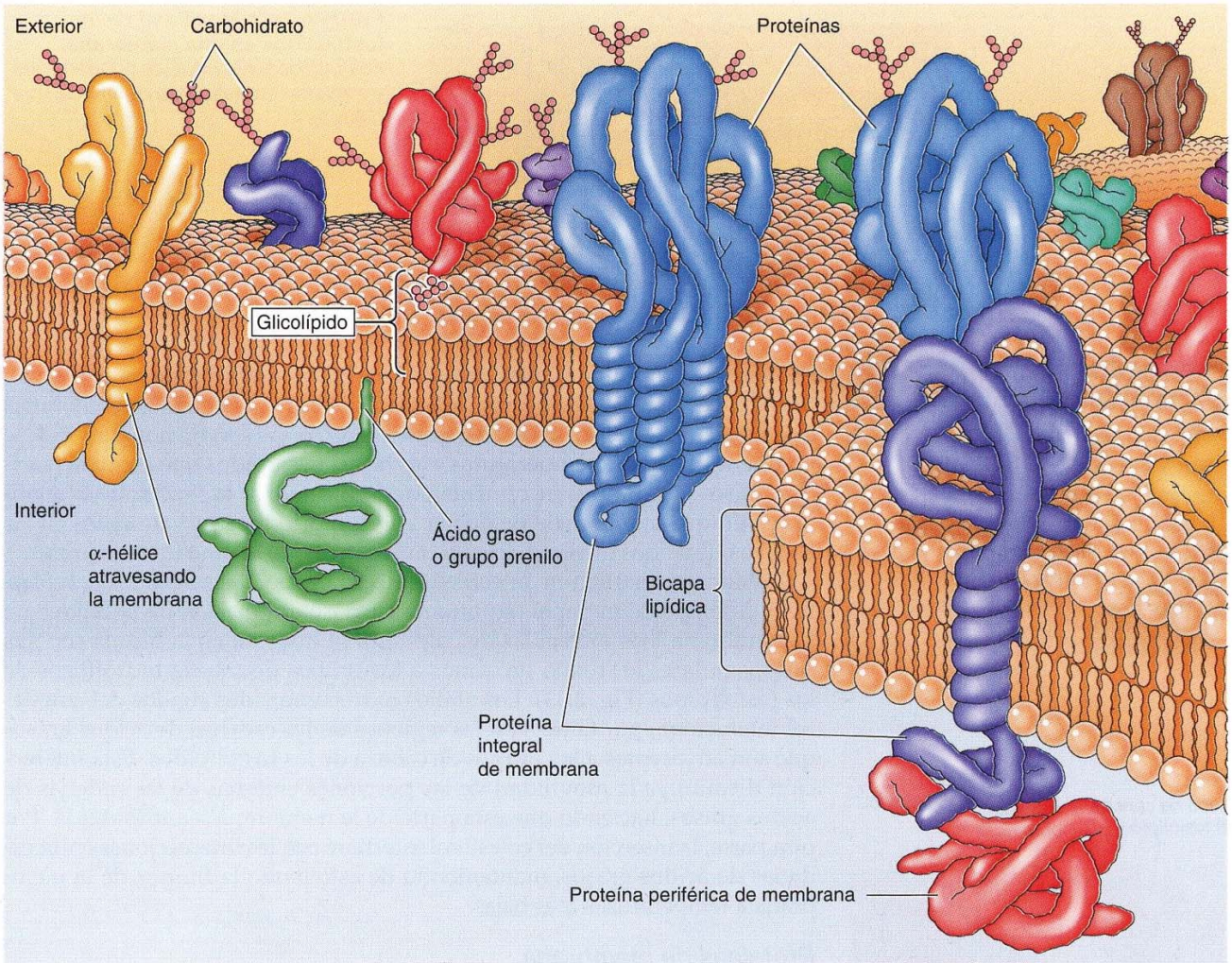


FIGURA 2.34 Modelo del mosaico fluido de la estructura de la membrana. Las membranas biológicas consisten en proteínas insertadas en una bicapa lipídica. Las proteínas integrales de membrana están embebidas en la membrana, habitualmente a través de regiones α-helicoidales de entre 20 a 25 aminoácidos hidrófobos. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la membrana una sola vez; otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. Además, algunas proteínas están ancladas en la membrana a través de lípidos que están ligados de forma covalente a la cadena polipeptídica. Estas proteínas pueden estar ancladas a la vertiente extracelular de la membrana por glicolípidos o a la vertiente citosólica por ácidos grasos o grupos prenilo (véanse las estructuras en el Cap. 9). Las proteínas periféricas de membrana no están insertadas en la membrana pero están adheridas a través de interacciones con proteínas integrales de membrana de fosfolípidos.

miento de las proteínas. La única otra estructura proteica conocida que atraviesa bicapas lipídicas es el **barril-β**, formada por el plegamiento de láminas-β en una estructura semejante a un barril, que se encuentra en algunas proteínas transmembrana de bacterias, cloroplastos y mitocondrias (**Fig. 2.35**). Como los fosfolípidos, las proteínas transmembrana son moléculas anfipáticas, con sus partes hidrófilas expuestas al medio acuoso a ambos lados de la membrana. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la membrana una sola vez; otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. La mayoría de las proteínas transmembrana de las membranas plasmáticas eucariotas han sido modificadas con la adición de carbohidratos, que están expuestos en la superficie de la célula y pueden participar en interacciones célula-célula.

Las proteínas también pueden estar ancladas en las membranas por lípidos que están ligados de forma covalente a la cadena polipeptídica (véase Cap. 9). Modificaciones lipídicas específicas anclan proteínas a las vertientes citosólica y extracelular de la membrana plasmática. Las proteínas pueden estar ancladas a la vertiente citosólica de la membrana bien por la adición de un ácido graso de 14 carbonos (ácido mirístico) a su extremo amino terminal o bien por la adición de un ácido graso de 16 carbonos (ácido palmítico) o de grupos prenilo de 15 o 20 carbonos a las cadenas laterales de los

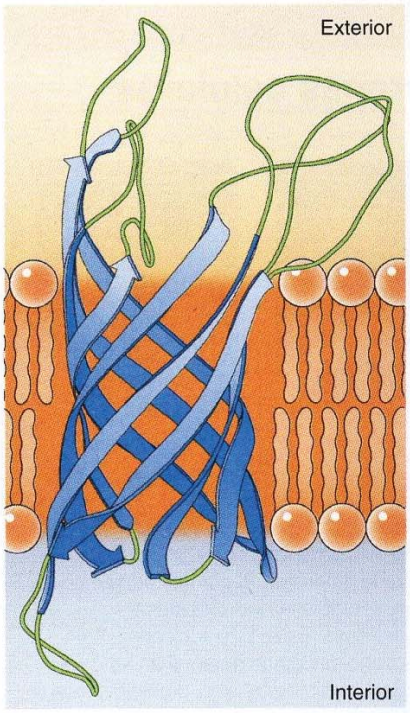


FIGURA 2.35 Estructura de un barril-β. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la bicapa fosfolipídica como láminas-β plegadas en una estructura semejante a un barril.

residuos de cisteína. De forma alternativa, las proteínas son ancladas a la vertiente extracelular de la membrana plasmática a través de la adición de glicolípidos a su extremo carboxilo terminal.

Transporte a través de membranas celulares

La permeabilidad selectiva de las membranas biológicas a las moléculas pequeñas permite a la célula controlar y mantener su composición interna. Sólo las moléculas pequeñas no cargadas pueden difundir libremente a través de las bicapas de fosfolípidos (**Fig. 2.36**). Las moléculas pequeñas no polares, como el O_2 y el CO_2, son solubles en la bicapa lipídica y, por tanto, pueden cruzar fácilmente las membranas celulares. Las moléculas polares pequeñas no cargadas, como el H_2O, también pueden difundir a través de las membranas, pero moléculas polares no cargadas mayores, como la glucosa, no pueden. Las moléculas cargadas, como los iones, son incapaces de difundir a través de una bicapa de fosfolípidos independientemente de su tamaño; incluso los iones H^+ no pueden cruzar una bicapa lipídica por difusión libre.

Aunque los iones y la mayoría de las moléculas polares no pueden difundir a través de una bicapa lipídica, muchas de estas moléculas (como la glucosa) son capaces de atravesar las membranas celulares. Estas moléculas pasan a través de las membranas gracias a la actuación de proteínas específicas transmembrana, que actúan como transportadores. Dichas proteínas de transporte determinan la permeabilidad selectiva de las membranas celulares, y de este modo desempeñan un papel crucial en la función de la membrana. Contienen múltiples regiones que atraviesan la membrana formando un conducto a través de la bicapa lipídica, permitiendo que moléculas polares o cargadas atraviesen la membrana por un poro proteínico sin interaccionar con las cadenas hidrófobas de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

Hay dos tipos principales de proteínas de transporte de membrana (**Fig. 2.37**). Los **canales proteínicos** forman poros abiertos a través de la membrana, permitiendo libremente el paso de cualquier molécula del tamaño adecuado. Los canales iónicos, por ejemplo, permiten el paso de iones inorgánicos como Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^- a través de la membrana plasmática. Los poros formados por estos canales proteínicos no están permanentemente abiertos; más bien, pueden ser abiertos o cerrados selectivamente en respuesta a señales extrace-

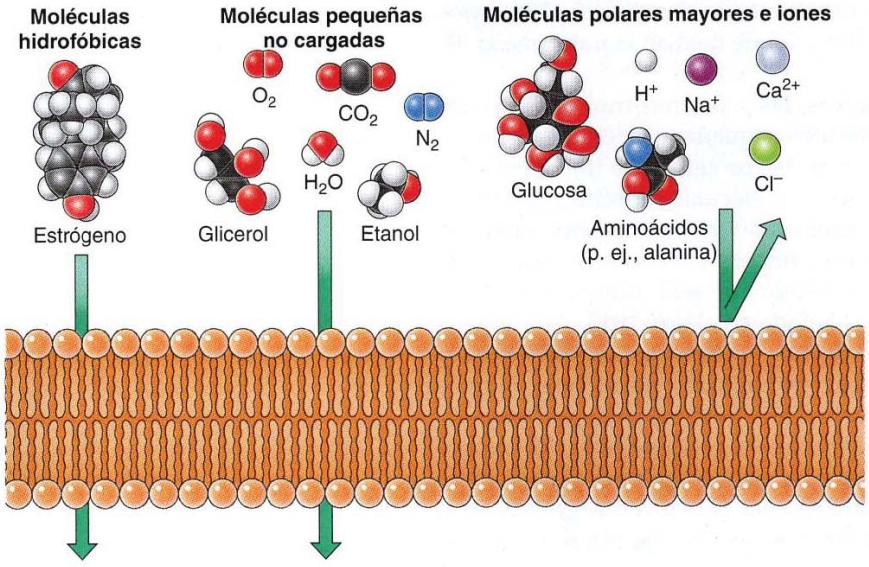


FIGURA 2.36 Permeabilidad de la bicapa de fosfolípidos. Gases hidrofóbicos y moléculas pequeñas no cargadas pueden difundir libremente a través de una bicapa de fosfolípidos. Sin embargo, la bicapa es impermeable a moléculas polares mayores (como la glucosa y los aminoácidos) y a los iones.

EXPERIMENTO CLAVE

Estructura de las membranas celulares

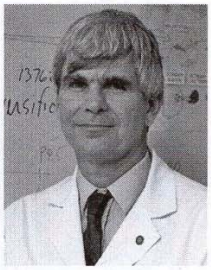
El modelo del mosaico fluido para la estructura de las membranas celulares

S. J. Singer y Garth L. Nicolson

University of California en San Diego y el Salk Institute for Biological Sciences, La Jolla, CA

Science, Volumen 175, 1972, págs. 720-731

S. J. Singer



Garth L. Nicolson

Contexto

Las membranas celulares juegan papeles centrales en prácticamente todos los aspectos de la biología celular, funcionando como límites de los orgánulos subcelulares de las células eucariotas además de definir a la propia célula separando su contenido del medio externo. La comprensión de la estructura y organización de las membranas celulares era, por tanto, un paso crítico en el análisis de la base molecular del comportamiento celular. En los años 60, se sabía que las membranas celulares estaban compuestas por proteínas y lípidos pero no estaba claro cómo estaban organizadas estas moléculas. Además, había una gran variación entre las composiciones de proteína y lípidos entre las diferentes membranas celulares, dando lugar a que algunos investigadores pensasen que las diferentes membranas podrían no compartir una organización estructural común.

Por el contrario, Jonathan Singer y Garth Nicolson se enfrentaron al problema de comprender la estructura de la membrana, basados en la premisa de que los mismos principios generales describirían la organización de lípidos y proteínas en todas las membranas celulares. Aplicaron los principios de termodinámica además de integrar una variedad de resultados experimentales para desarrollar el modelo del mosaico fluido —un modelo que se ha establecido en el tiempo para la comprensión de las diversas funciones de las membranas en la biología celular.

Experimentos

Las consideraciones de termodinámica fueron básicas para el desarrollo del modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson. En particular, pensaron que la estructura general de las membranas estaría determinada por una combinación de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. Estas interacciones fueron reconocidas como determinantes de la organización de bicapas de fosfolípidos, y Singer y Nicolson pensaron que interacciones similares gobernarían la organización de las proteínas de membrana. Propusieron, por tanto, que los residuos de aminoácidos apolares de las proteínas de membrana estarían secuestrados en el interior de la membrana, de forma similar a las cadenas de fosfolípidos de los ácidos grasos, mientras que los grupos polares de las proteínas estarían expuestos al ambiente acuoso. Estos argumentos

lulares, permitiendo a la célula controlar el movimiento de iones a través de la membrana. Estos canales iónicos regulados han sido bien estudiados, especialmente en células nerviosas y musculares, donde median la transmisión de señales electroquímicas.

En contraste con los canales proteínicos, las **proteínas transportadoras** unen y transportan selectivamente moléculas pequeñas específicas, como la glucosa. En vez de formar canales abiertos, las proteínas de transporte actúan como enzimas para facilitar el paso de moléculas específicas a través de las membranas. En particular, las proteínas de transporte unen moléculas específicas y después experimentan cambios conformacionales que abren canales a través de los cuales la molécula que será transportada puede pasar a través de la membrana y ser liberada en el otro lado.

Como se describe hasta ahora, las moléculas transportadas bien a través de canales proteínicos o de proteínas transportadoras cruzan las membranas en la dirección energéticamente favorable, determinada por los gradientes de concentración y electroquímico —un proceso conocido como **transporte pasivo**—. Sin embargo, las proteínas transportadoras también proporcionan un mecanismo a través del cual los cambios energéticos asociados con el transporte de moléculas a través de una membrana pueden

EXPERIMENTO CLAVE

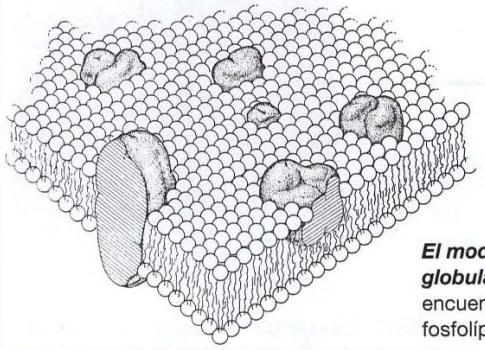
estaban en contra del modelo anterior de estructura de membrana en el que se proponía que las membranas poseían una estructura en tres capas y consistía en una bicapa lipídica interna flanqueada por dos capas de proteínas.

Singer y Nicolson propusieron por el contrario, una estructura de mosaico, en el que las proteínas integrales de membrana globulares estaban insertadas en una bicapa fosfolipídica (véase figura). Las proteínas, al igual que los fosfolípidos, se postulaban como antipáticos, con regiones apolares insertadas en la bicapa lipídica y regiones polares expuestas hacia el medio acuoso. La bicapa lipídica se creía que constituía una matriz estructural de la membrana en la que estaban insertadas las proteínas.

Diversas líneas de evidencia experimental fueron citadas para apoyar el modelo del mosaico fluido. Primero, la microscopia electrónica de membranas empleando la técnica de fractura por congelación proporcionó pruebas directas sugiriendo que las proteínas estaban incluidas en la bicapa lipídica (véase Fig. 1.37). Además, como predecía el modelo del mosaico fluido, las proteínas se encontraban distribuidas aleatoriamente en el plano de la membrana cuando eran detectadas mediante la tinción superficial de las células. Y, finalmente, como se verá en el Capítulo 14, los experimentos de Larry Frye y Michael Edidin demostraron que las proteínas podían moverse lateralmente a través de la membrana. Múltiples enfoques experimentales indicaron así que las proteínas de membrana estaban insertadas y capaces de moverse lateralmente a través de la bicapa lipídica, proporcionando un fuerte apoyo para el modelo del mosaico fluido para la estructura de membrana.

Impacto

El modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson ha sido apoyado de forma abundante por experimentación subsiguiente, y sigue representando nuestra comprensión básica de la estructura de la membrana celular. Dados los diversos papeles de las membranas en la biología celular, el modelo del mosaico fluido es, por tanto, fundamental para la comprensión de prácticamente todos los aspectos del comportamiento celular, incluyendo fenómenos tan diversos como el metabolismo energético, la acción hormonal y la transmisión de información entre células nerviosas en la sinapsis. Basado inicialmente en consideraciones termodinámicas de las propiedades de lípidos y proteínas, Singer y Nicolson desarrollaron un modelo de estructura de membrana que ha tenido gran impacto en todos los aspectos de la biología celular.



El modelo del mosaico lípido-proteína globular. Las proteínas globulares se encuentran distribuidas en una matriz de fosfolípidos.

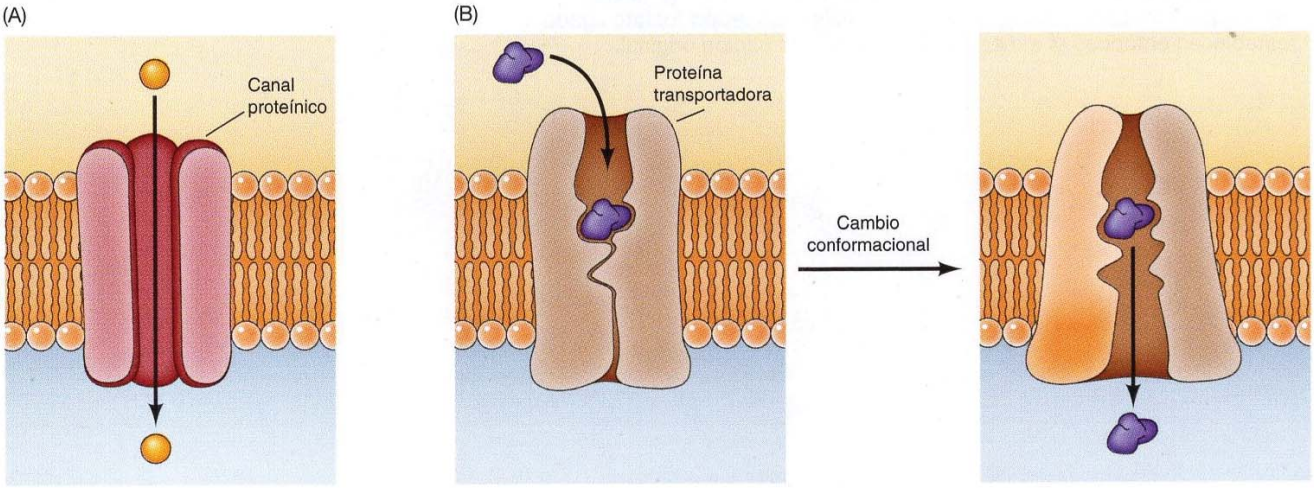


FIGURA 2.37 Canales proteínicos y proteínas de transporte. (A) Los canales proteínicos forman poros abiertos a través de los cuales las moléculas del tamaño apropiado (p. ej., iones) pueden cruzar la membrana. (B) Las proteínas transportadoras unen selectivamente las pequeñas moléculas que serán transportadas y entonces experimentan un cambio conformacional para liberar la molécula al otro lado de la membrana.

ser acoplados a la utilización o producción de otras formas de energía metabólica, igual que las reacciones enzimáticas pueden ser acopladas a la hidrólisis o síntesis de ATP. Por ejemplo, las moléculas pueden ser transportadas en una dirección energéticamente desfavorable a través de una membrana (p. ej., contra un gradiente de concentración) si su transporte en esa dirección está acoplado a la hidrólisis de ATP como fuente de energía —un proceso denominado **transporte activo** (**Fig. 2.38**)—. Las proteínas de membrana pueden, por tanto, emplear energía libre almacenada como ATP para controlar la composición interna de la célula.

ANIMACIÓN 2.4

sites.sinauer.com/cooper7e/a2.4

Transporte pasivo. La difusión pasiva y la difusión facilitada son tipos de transporte pasivo por los que algunas moléculas atraviesan las membranas biológicas.

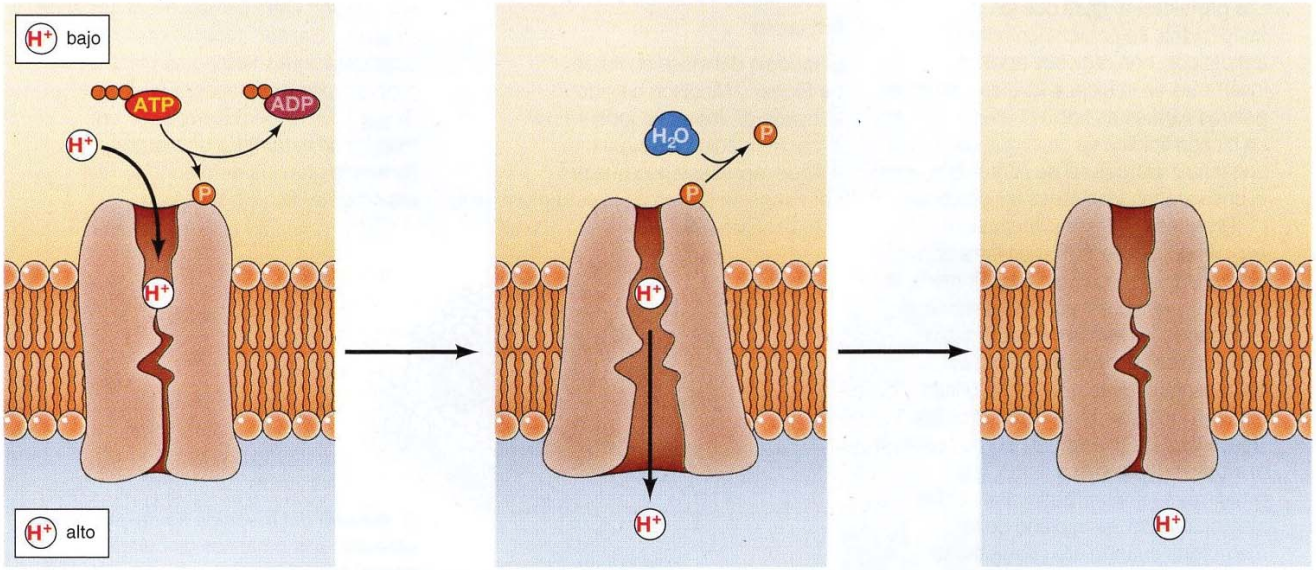


FIGURA 2.38 Modelo de transporte activo. La energía derivada de la hidrólisis de ATP es empleada para transportar H^+ en contra de un gradiente electroquímico (de una baja a una alta concentración de H^+). La unión de H^+ está acompañada por la fosforilación de la proteína de transporte, lo que induce un cambio conformacional que promueve el transporte de H^+ contra el gradiente electroquímico. La liberación de H^+ y la hidrólisis del grupo fosfato ligado restablecen entonces el transportador a su conformación original.

RESUMEN

Moléculas de las células

Carbohidratos: Los carbohidratos incluyen azúcares simples y polisacáridos. Los polisacáridos sirven como formas de almacenamiento de azúcares, componentes estructurales de las células y marcadores en procesos de reconocimiento celular.
Ver Animación 2.1

PALABRAS CLAVE: **hidrófilo, hidrófobo, carbohidrato, monosacárido, enlace glicosídico, oligosacárido, polisacárido, glucógeno, almidón, celulosa, quitina**

Lípidos: Los lípidos son los principales componentes de las membranas celulares, y sirven como depósito de energía y moléculas de señalización. Los fosfolípidos consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos unidas a un grupo hidrófilo de cabeza que contiene fosfato.

lípido, ácido graso, triacilglicerol, grasa, fosfolípido, glicerol fosfolípido, esfingomielina, anfipático, glicolípido, colesterol, hormona esteroidea

Ácidos nucleicos: Los ácidos nucleicos son las principales moléculas de información de la célula. Tanto el ADN como el ARN son polímeros de nucleótidos de purina y pirimidina. Los enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias permiten a los ácidos nucleicos dirigir su propia replicación.

ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), nucleótido, purina, pirimidina, adenina, guanina, citosina, timina, uracilo, 2'-desoxirribosa, ribosa, nucleósido, enlace fosfodiéster, oligonucleótido, polinucleótido

Proteínas: Las proteínas son polímeros de 20 aminoácidos distintos, cada uno de los cuales tiene una cadena lateral distinta con propiedades químicas específicas. Cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos propia, que determina su estructura tridimensional. En la mayoría de las proteínas, combinaciones de α-hélices y hojas β se pliegan en dominios globulares con aminoácidos hidrófobos en el interior y aminoácidos hidrófilos en la superficie.
Ver Vídeo 2.1

proteína, aminoácido, enlace peptídico, polipéptido, cristalografía de rayos X, estructura primaria, estructura secundaria, α-hélice, hoja β, estructura terciaria, dominio, estructura cuaternaria

Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos

Actividad catalítica de las enzimas: Prácticamente todas las reacciones químicas dentro de las células son catalizadas por enzimas.
Ver Animación 2.2

enzima, sustrato, producto, estado de transición, energía de activación, sitio activo

Mecanismos de catálisis enzimática: Las enzimas incrementan la velocidad de las reacciones uniendo sustratos en la posición adecuada, alterando la conformación de los sustratos para aproximarlos al estado de transición, y participando directamente en las reacciones químicas.
Ver Animación 2.3

modelo de la llave y la cerradura, ajuste inducido

Coenzimas: Las coenzimas trabajan junto con las enzimas para transportar grupos bioquímicos entre sustratos.

grupo prostético, coenzima, nicotidamín adenín dinucleótido (NAD^+)

Regulación de la actividad enzimática: Las actividades de las enzimas son reguladas para cubrir las necesidades fisiológicas de la célula. La actividad enzimática puede ser controlada a través de la unión de moléculas pequeñas, de interacciones con otras proteínas y de modificaciones covalentes.

inhibición por retroalimentación, regulación alostérica, fosforilación

Membranas celulares

Lípidos de membrana: La estructura básica de todas las membranas celulares es una bicapa de fosfolípidos. Las membranas de células animales también contienen glucolípidos y colesterol.
Ver Vídeo 2.2

bicapa de fosfolípidos

RESUMEN

Proteínas de membrana: Las proteínas pueden estar insertadas en la bicapa lipídica o bien asociadas a la membrana indirectamente, a través de interacciones proteína-proteína. Algunas proteínas atraviesan la bicapa lipídica; otras están ancladas a una vertiente de la membrana.

Transporte a través de membranas celulares: Las bicapas lipídicas son permeables sólo a moléculas pequeñas no cargadas. Los iones y la mayoría de las moléculas polares son transportados a través de las membranas celulares por proteínas de transporte específicas, cuya actuación puede ser acoplada a la hidrólisis o síntesis de ATP.

Ver Animación 2.4

PALABRAS CLAVE

mosaico fluido, proteína integral de membrana, proteína periférica de membrana, proteína transmembrana, barril-β

canal proteico, proteína transportadora, transporte pasivo, transporte activo

Preguntas

1. ¿Qué características del agua contribuyen a su función como la molécula más abundante de las células?
2. A pesar de que el glucógeno y la celulosa están compuestos por monómeros de glucosa, son químicamente distintos. ¿En qué sentido?
3. Cuáles son las principales funciones de las grasas y los fosfolípidos en las células?
4. Además de servir como bloques de construcción para los ácidos nucleicos, ¿qué otras funciones importantes poseen los nucleótidos en las células?
5. Si eliminas todas las bases de una molécula de ARNm, ¿podría seguir funcionando como molécula transporadora de información?
6. ¿Cuál era la evidencia experimental que demostró que la información necesaria para el plegamiento de proteínas está contenida en la secuencia de sus aminoácidos?
7. ¿Cómo facilita la cadena lateral de la cisteína el plegamiento de algunas proteínas?
8. ¿Cuáles son los papeles biológicos del colesterol?
9. ¿Por qué son las regiones que atraviesan la membrana de las proteínas transmembrana frecuentemente α-hélices? ¿Qué otra estructura proteica es capaz de atravesar membranas?
10. ¿Cuál de los siguientes aminoácidos es más probable encontrarse en una α-hélice transmembrana?

    a) Lisina
    b) Glutamina
    c) Ácido aspártico
    d) Alanina
    e) Arginina

11. La unión de tripsina contiene un residuo de aspartato. ¿Cómo cambia este aminoácido a lisina y afectan la actividad de la enzima?
12. ¿Qué característica de histidina permite desempeñar un papel en las reacciones enzimáticas que implican el cambio de iones de hidrógeno?
13. ¿Cómo se diferencian las proteínas portadoras de proteínas de canal?

Bibliografía

Moléculas de las células

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. Science 181: 223–230. [P]

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2011. Biochemistry. 7th ed. New York: W. H. Freeman.

Branden, C. and J. Tooze. 1999. Introduction to Protein Structure. 2nd ed. New York: Garland.

Braselmann, E., J. L. Chaney and P. L. Clark. 2013. Folding the proteome. Trends Biochem. Sci. 38: 337–344. [R]

Dill, K. A. and J. L. MacCallum. 2012. The protein-folding problem, 50 years on. Science 338: 1042–1046. [R]

Kendrew, J. C. 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule. Sci. Am. 205(6): 96–111. [R]

Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2012. Lehninger Principles of Biochemistry. 6th ed. New York: W. H. Freeman.

Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The structure of proteins: Two hydrogen bonded configurations of the polypeptide chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37: 205–211. [P]

Petsko, G. A. and D. Ringe. 2003. Protein Structure and Function. Sunderland, Mass.: Sinauer.

Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, and sequences. Ann. Rev. Biochem. 57: 1–28. [R]

Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. Science 200: 1012–1018. [R]

Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos

Changeux, J.-P. 2013. 50 years of allosteric interactions: the twists and turns of the models. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 14: 819–829. [R]

Fersht, A. 1999. Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. New York: W. H. Freeman.

Koshland, D. E. 1984. Control of enzyme activity and metabolic pathways. Trends Biochem. Sci. 9: 155–159. [R]

Laskowski, R. A., F. Gerick and J. M. Thornton. 2009. The structural basis of allosteric regulation in proteins. FEBS Letters. 583: 1692–1698. [R]

Lienhard, G. E. 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. Science 180: 149–154. [R]

Lipscomb, W. N. 1983. Structure and catalysis of enzymes. Ann. Rev. Biochem. 52: 17–34. [R]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. J. Mol. Biol. 6: 306–329. [P]

Narlikar, G. J. and D. Herschlag. 1997. Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: Lessons from comparison of RNA and protein enzymes. Ann. Rev. Biochem. 66: 19–59. [R]

Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. Science 224: 350–357. [R]

Petsko, G. A. and D. Ringe. 2003. Protein Structure and Function. Sunderland, Mass: Sinauer.

Schramm, V. L. 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. Ann. Rev. Biochem. 67: 693–720. [R]

Membranas celulares

Bretscher, M. 1985. The molecules of the cell membrane. Sci. Am. 253(4): 100–108. [R]

Dowham, W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? Ann. Rev. Biochem. 66: 199–212. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. Ann. Rev. Biochem. 62: 121–138. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. J. Biol. Chem. 276: 39501–39504. [R]

Lacapere, J.-J., E. Pebay-Peyroula, J.-M. Neumann and C. Etchebest. 2007. Determining membrane protein structures: still a challenge! Trends Biochem. Sci. 32: 259–270. [R],

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. Ann. Rev. Cell Biol. 6: 247–296. [R]

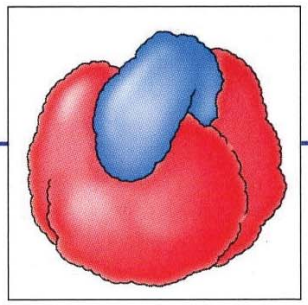
Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720–731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembly of β-barrel membrane proteins. J. Biol. Chem. 276: 32399–32402. [R]

Towler, D. A., J. I. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser. 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. Ann. Rev. Biochem. 57: 69–99. [R]

White, S. H., A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe and K. Hristova. 2001. How membranes shape protein structure. J. Biol. Chem. 276: 32395–32398. [R]

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. Ann. Rev. Biochem. 65: 241–269. [R]



Capítulo 3

Bioenergía y metabolismo

Energía metabólica y ATP 81

Transporte de electrones y fosforilación oxidativa 89

Fotosíntesis 95

Biosíntesis de los componentes celulares 101

EXPERIMENTO CLAVE: Teoría quimiosmótica 92

EXPERIMENTO CLAVE: Antimetabolitos y quimioterapia 105

Casi todas las actividades celulares, incluido el movimiento, el transporte en las membranas y la síntesis de los componentes de las células, necesitan energía. Por tanto, la generación y el uso de la energía metabólica son fundamentales para el conjunto de la biología celular. Todas las células utilizan ATP como fuente de energía metabólica, y en este capítulo se exponen los mecanismos que emplean para la generación de ATP, ya sea por la descomposición de moléculas orgánicas o por fotosíntesis. Además, en el capítulo se presenta una visión general de la red de reacciones químicas que constituyen el metabolismo de la célula y son responsables de la síntesis de todos los principales componentes celulares, entre ellos los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

Energía metabólica y ATP

La energía es un requisito básico para las tareas que debe realizar una célula, ante lo cual una gran parte de las actividades celulares se dedican a obtener energía a partir del entorno y a utilizar dicha energía para alimentar las reacciones que la necesitan. Tal como se ha indicado en el capítulo anterior, las enzimas controlan las velocidades prácticamente de todas las reacciones químicas que se producen dentro de las células y, por tanto, determinan aquellas reacciones que pueden tener lugar en las suaves condiciones de las células vivas. No obstante, las enzimas únicamente controlan las velocidades de reacción; la posición de equilibrio de las reacciones químicas no se ve afectada por la catálisis enzimática. Más bien, las leyes de la termodinámica gobiernan el equilibrio químico y determinan la dirección energéticamente favorable en todas las reacciones químicas. Muchas de las reacciones que deben tener lugar dentro de las células son energéticamente desfavorables, y, por tanto, sólo pueden producirse con un ingreso adicional de energía. En consecuencia, las células deben generar y gastar constantemente energía derivada del entorno.

Energía libre y ATP

La energética de las reacciones bioquímicas se describe mejor en términos de función termodinámica denominada **energía libre de Gibbs (*G*),** así llamada por Josiah Willard Gibbs. La variación en la energía libre (ΔG) de una reacción combina los efectos de cambios en la entalpía (el calor que se libera o es absorbido durante una reacción química) y la entropía (el grado de desorden que resulta de una reacción) para predecir si una reacción es o no energéticamente favorable. Todas las reacciones químicas progresan espotáneamente en la dirección energéticamente favorable, acompañadas por un

descenso en la energía libre ($\Delta G < 0$). Por ejemplo, considérese una hipotética reacción en la que A se convierte en B:

$$A \rightleftharpoons B$$

Si $\Delta G < 0$, esta reacción progresará en la dirección directa, como se ha escrito. Si $\Delta G > 0$, sin embargo, la reacción progresará en la dirección inversa y B se convertirá en A.

La ΔG de una reacción viene determinada no sólo por las propiedades intrínsecas de los reactantes y los productos, sino también por sus concentraciones y otras condiciones de la reacción (p. ej., la temperatura). De este modo, es útil definir la variación de energía libre de una reacción en condiciones estándar. (Las condiciones estándar se considera que son 1 M de concentración de todos los reactantes y productos y 1 atm de presión.) La variación de energía libre estándar ($\Delta G°$) de una reacción está directamente relacionada con su situación de equilibrio porque la ΔG actual es una función de tanto $\Delta G°$ como de las concentraciones de reactantes y productos. Por ejemplo, considérese la reacción:

$$A \rightleftharpoons B$$

La variación de energía libre puede escribirse como sigue:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln [B]/[A]$$

donde R es la constante de gases y T es la temperatura absoluta.

En equilibrio, $\Delta G = 0$ y la reacción no progresa en ninguna dirección. La constante de equilibrio para la reacción ($K = [B]/[A]$ en equilibrio) está de este modo directamente relacionada con $\Delta G°$ por la reacción anterior, que puede expresarse como sigue:

$$0 = \Delta G° + RT \ln K$$

o

$$\Delta G° = -RT \ln K$$

Si la relación actual $[B]/[A]$ es mayor que la razón de equilibrio (K), $\Delta G > 0$ y la acción procede en el sentido inverso (conversión de B en A). Por otra parte, si la razón $[B]/[A]$ es menor que la razón de equilibrio, $\Delta G < 0$ y A es convertida en B.

La variación de energía libre estándar ($\Delta G°$) de una reacción determina, por tanto, su equilibrio químico y predice en qué dirección progresará la reacción en cualquier conjunto dado de condiciones. Para las reacciones bioquímicas, la variación de energía libre estándar se expresa habitualmente como $\Delta G°'$, que es la variación de energía libre estándar de una reacción en un medio acuoso a pH = 7, aproximadamente las condiciones dentro de una célula.

Muchas reacciones biológicas (como la síntesis de macromoléculas) son termodinámicamente desfavorables ($\Delta G > 0$) en condiciones celulares. Para que estas reacciones puedan progresar, se necesita una fuente adicional de energía. Por ejemplo, considérese la reacción

$$A \rightleftharpoons B \qquad \Delta G = +10 \text{ kcal/mol}$$

La conversión de A en B es energéticamente desfavorable, de modo que la reacción progresa en la dirección inversa en vez de en la directa. Sin embargo, la dirección puede conducirse en la dirección directa acoplando la conversión de A en B con una reacción energéticamente favorable, como:

$$C \rightleftharpoons D \qquad \Delta G = -20 \text{ kcal/mol}$$

Si estas dos reacciones se combinan, la reacción combinada puede escribirse como sigue:

$$A + C \rightleftharpoons B + D \qquad \Delta G = -10 \text{ kcal/mol}$$

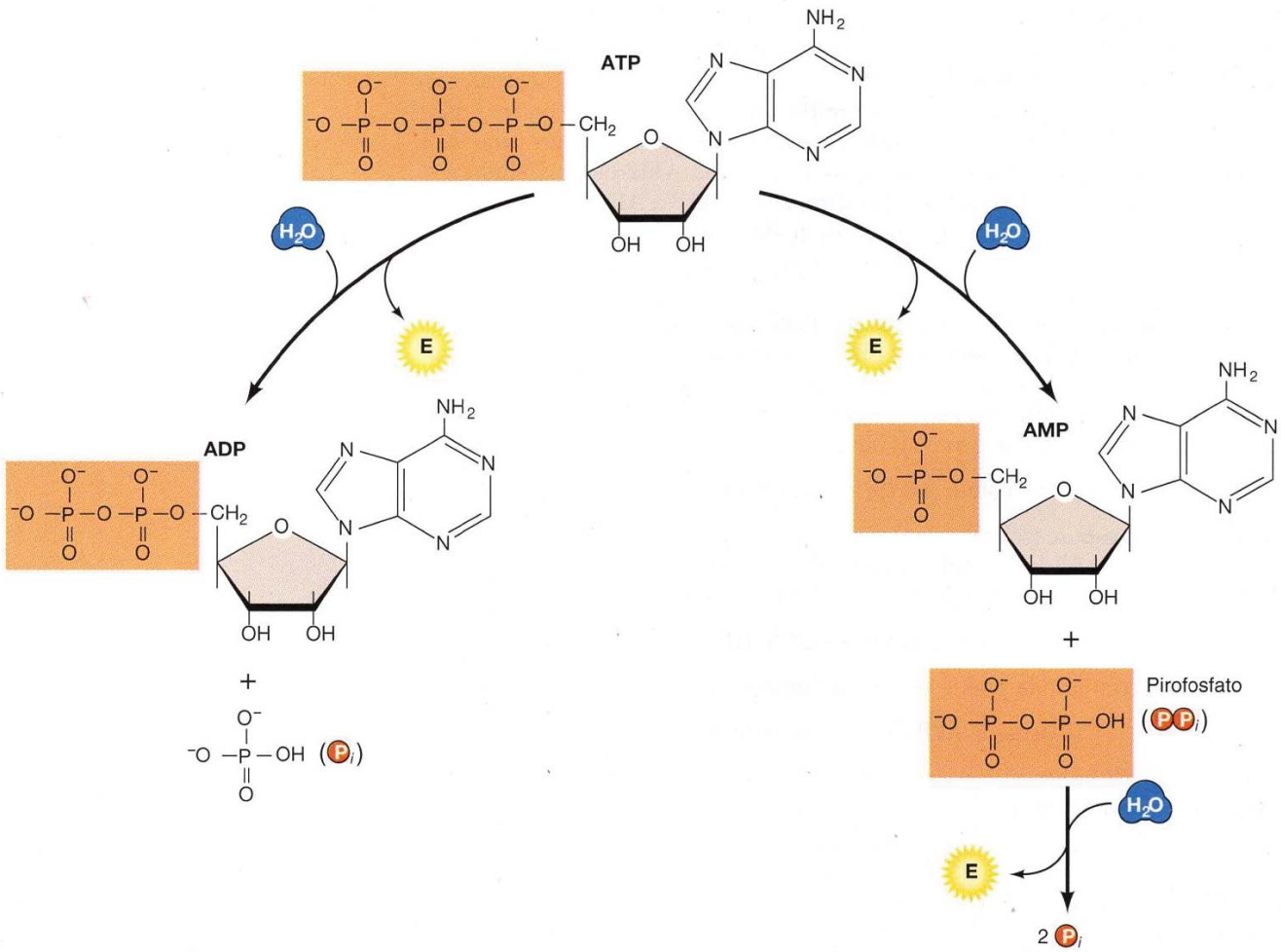


FIGURA 3.1 El ATP como depósito de energía libre. Los enlaces entre los grupos fosfato del ATP se denominan enlaces de alta energía porque su hidrólisis produce un gran descenso de la energía libre. El ATP puede ser hidrolizado bien a ADP más un grupo fosfato (HPO_4^{2-}) o a AMP más pirofosfato. En este último caso, el pirofosfato es a su vez rápidamente hidrolizado, liberando energía libre adicional.

La ΔG de la reacción combinada es la suma de las variaciones en la energía libre de sus componentes individuales, así que la reacción combinada es energéticamente favorable y progresará como se describe. De este modo, la conversión energéticamente desfavorable de *A* en *B* está facilitada por su combinación con una segunda reacción asociada con una gran disminución en la energía libre. Las enzimas son responsables de llevar a cabo estas reacciones combinadas de una forma coordinada.

La célula utiliza este mecanismo básico para facilitar las muchas reacciones energéticamente desfavorables que deben tener lugar en los sistemas biológicos. El **adenosín 5′-trifosfato (ATP)** desempeña un papel protagonista en este proceso actuando como un depósito de energía libre dentro de la célula (**Fig. 3.1**). Los enlaces entre los fosfatos del ATP se conocen como **enlaces de alta energía** porque su hidrólisis se acompaña de un descenso relativamente grande en la energía libre. No hay nada especial en los enlaces químicos en sí mismos; se denominan enlaces de alta energía sólo porque una gran cantidad de energía libre se libera cuando son hidrolizados dentro de la célula. En la hidrólisis del ATP a ADP más fosfato (P_i), $\Delta G^{\circ\prime}$ = = –7,3 kcal/mol. Recuérdese, sin embargo, que $\Delta G^{\circ\prime}$ se refiere a las «condiciones estándar» en las que las concentraciones de todos los productos y reactantes son de 1 *M*. Las concentraciones reales de P_i son aproximadamente de 10^{-2} *M*, y las concentraciones intracelulares de ATP son mayores de las de ADP. Estas diferencias entre las concentraciones intracelulares y las del estado estándar favorecen la hidrólisis de ATP, así que para la hidrólisis de ATP dentro de la célula ΔG es aproximadamente –12 kcal/mol.

De forma alternativa, el ATP puede ser hidrolizado a AMP más pirofosfato (PP_i). Esta reacción produce aproximadamente la misma cantidad de energía libre que la hidrólisis de ATP a ADP. Sin embargo, el pirofosfato producido en esta reacción a su vez rápidamente se hidroliza, con una ΔG similar a la de la hidrólisis de ATP. De este modo, la variación total de energía libre que resulta de la hidrólisis de ATP a AMP es aproximadamente el doble de la obtenida de la hidrólisis de ATP a ADP. En comparación, el enlace entre el azúcar y el grupo fosfato del AMP, en vez de tener alta energía, es un típico enlace covalente; para la hidrólisis de AMP, $\Delta G^{\circ\prime} = -3{,}3$ kcal/mol.

Debido al descenso acompañante en la energía libre, la hidrólisis de ATP puede emplearse para promover otras reacciones que requieren energía dentro de la célula. Por ejemplo, la primera reacción de la glicólisis (tratada en la siguiente sección) es la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato. La reacción puede escribirse como sigue:

$$\text{Glucosa} + \text{Fosfato } (HPO_4^{2-}) \rightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + H_2O$$

Debido a que esta reacción es energéticamente desfavorable tal y como está escrita ($\Delta G^{\circ\prime} = +3{,}3$ kcal/mol), debe facilitarse en la dirección directa acoplándose a la hidrólisis de ATP ($\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3$ kcal/mol):

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

La reacción combinada puede escribirse como sigue:

$$\text{Glucosa} + ATP \rightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + ADP$$

La variación de energía libre para esta reacción es la suma de las variaciones de energía libre de las reacciones individuales, así que para la reacción combinada $\Delta G^{\circ\prime} = -4{,}0$ kcal/mol, favoreciendo la formación de glucosa-6-fosfato.

Otras moléculas, incluyendo otros nucleótidos trifosfatos (p. ej., guanosina 5-trifosfato, GTP), también tienen enlaces de alta energía y pueden utilizarse como el ATP para promover reacciones que requieren energía. Para la mayoría de las reacciones, sin embargo, el ATP proporciona la energía libre. Las reacciones que producen energía dentro de la célula están, por tanto, acopladas a la síntesis de ATP, mientras que las reacciones que requieren energía están acopladas a la hidrólisis de ATP. Los enlaces de alta energía del ATP desempeñan de este modo un papel crucial en el metabolismo celular al servir como forma de depósito de energía libre utilizable, para alimentar las reacciones que necesitan energía. La hidrólisis de ATP puede sostener asimismo el transporte de moléculas, que necesita energía, en contra de un gradiente de concentración (transporte activo, véase Fig. 2.38) y los movimientos celulares, como la contracción muscular y los movimientos de los cromosomas durante la mitosis (analizado en el Capítulo 13).

Glicólisis y el ciclo de Krebs

La degradación de carbohidratos, particularmente glucosa, es la fuente principal de energía celular. La degradación oxidativa completa de glucosa a CO_2 y H_2O puede escribirse como sigue:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

La reacción produce una gran cantidad de energía libre: $\Delta G^{\circ\prime} = -686$ kcal/mol. Para convertir esta energía en una forma utilizable, la glucosa se oxida dentro de las células en una serie de pasos acoplados a la síntesis de ATP.

La **glicólisis**, la etapa inicial en la degradación de glucosa, es similar prácticamente en todas las células. La glicólisis ocurre en ausencia de oxíge-

ANIMACIÓN 3.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a3.1

Glicólisis. La glicólisis es la fase inicial de la degradación de la glucosa, resultando en dos moléculas de piruvato y una ganancia neta de dos moléculas de ATP.

no y puede proporcionar toda la energía metabólica de organismos anaerobios. En las células aerobias, sin embargo, la glicólisis es sólo la primera etapa en la degradación de glucosa.

Las reacciones de la glicólisis dan lugar a la degradación de glucosa a piruvato, con una ganancia neta de dos moléculas de ATP (**Fig. 3.2**). Las reacciones iniciales de la vía de hecho consumen energía, usando el ATP para fosforilar la glucosa a glucosa-6-fosfato y luego la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato. Las enzimas que catalizan estas dos reacciones —hexoquinasa y fosfofructoquinasa respectivamente— son importantes puntos reguladores de la vía glucolítica. El principal elemento de control es la fosfofructoquinasa, que es inhibida por niveles altos de ATP. La inhibición de la fosfofructoquinasa da lugar al acúmulo de la glucosa-6-fosfato, que a su vez inhibe a la hexoquinasa. De este modo, cuando la célula tiene un suministro adecuado de energía metabólica disponible en forma de ATP, se inhibe la degradación de glucosa.

Las reacciones que siguen a la formación de fructosa-1,6-difosfato constituyen la parte productora de energía de la vía glucolítica. La degradación de fructosa-1,6-difosfato produce dos moléculas del azúcar de tres carbonos gliceraldehído-3-fosfato, que se oxida a 1,3-difosfoglicerato. El grupo fosfato de este compuesto tiene una energía libre de hidrólisis muy alta ($\Delta G°' = 11{,}5$ kcal/mol), así que se utiliza en la siguiente reacción de la glicólisis para promover la síntesis de ATP a partir de ADP. El producto de esta reacción, 3-fosfoglicerato, se convierte entonces en fosfoenolpiruvato, el segundo intermediario de alta energía de la glicólisis. En la hidrólisis del fosfato de alta energía del fosfoenolpiruvato, $\Delta G°' = -14{,}6$ kcal/mol, su conversión a piruvato está acoplada a la síntesis de ATP. Cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato convertida a piruvato se acopla de este modo a la generación de dos moléculas de ATP; en total, se sintetizan cuatro moléculas de ATP a partir de cada molécula inicial de glucosa. Puesto que se requieren dos ATP para promover las reacciones iniciales, la ganancia neta de la glicólisis es de dos moléculas de ATP.

Además de producir ATP, la glicólisis convierte dos moléculas de coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a NADH. En esta reacción, el NAD^+ actúa como un agente oxidante que acepta electrones del gliceraldehído-3-fosfato. El NADH formado como producto debe ser reciclado sirviendo como donante de electrones para otras reacciones redox dentro de la célula. En condiciones anaeróbicas, el NADH formado durante la glicólisis se reoxida a NAD^+ por la conversión de piruvato a lactato o etanol. En organismos aerobios, sin embargo, el NADH sirve como una fuente adicional de energía al donar sus electrones a la cadena de transporte de electrones, donde finalmente se utilizan para reducir O_2 a H_2O, acoplado a la generación de ATP adicional.

La glucólisis tiene lugar en el citosol. En las células eucariotas, el piruvato se transporta entonces, donde su oxidación completa a CO_2 y H_2O proporciona la mayoría del ATP derivado de la degradación de glucosa. El siguiente paso en el metabolismo del piruvato es su descarboxilación oxidativa en presencia de la **coenzima A (CoA-SH),** que funciona como transportador de grupos acetilo en diversas reacciones metabólicas (**Fig. 3.3**). Un carbono del piruvato se libera como CO_2, y los dos carbonos restantes se unen a la CoA-SH para formar acetil-CoA. En este proceso, una molécula de NAD^+ se reduce a NADH.

El acetil-CoA formado en esta reacción entra en el **ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs** (**Fig. 3.4**), que es la vía central en el metabolismo oxidativo. El grupo acetilo de dos carbonos se combina con oxalacetato (cuatro carbonos) para producir citrato (seis carbonos). A través de otras ocho reacciones, dos carbonos del citrato se oxidan completamente a CO_2 y se regenera el

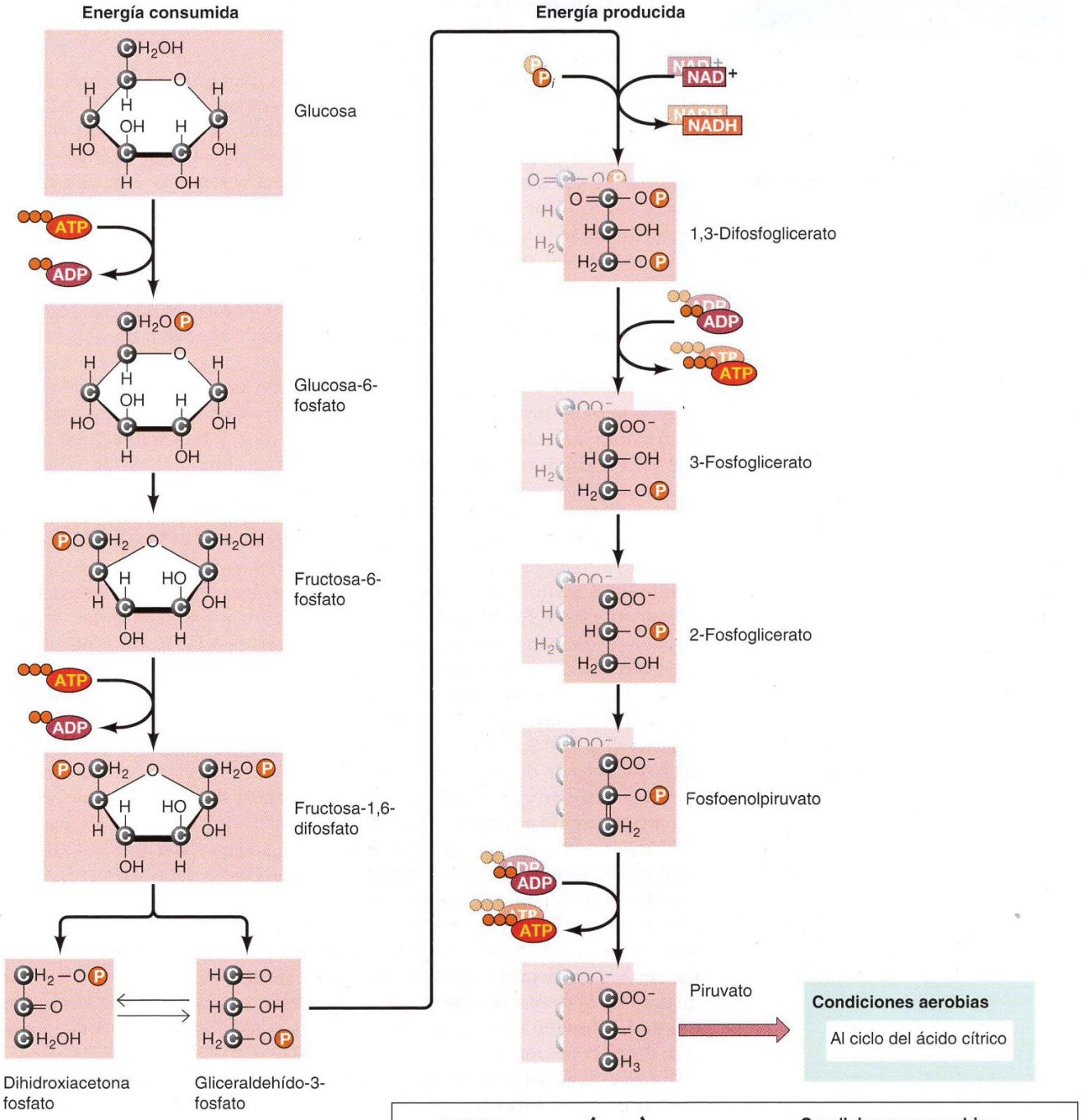


FIGURA 3.2 Reacciones de la glicólisis. La glucosa se degrada a piruvato, con la formación neta de dos moléculas tanto de ATP como de NADH. En condiciones aerobias, el piruvato continúa metabolizándose en el ciclo del ácido cítrico. En condiciones anaerobias, el NADH se reoxida mediante la conversión del piruvato a etanol o lactato. Obsérvese que una única molécula de glucosa produce dos moléculas de cada uno de los derivados de tres carbonos productores de energía.

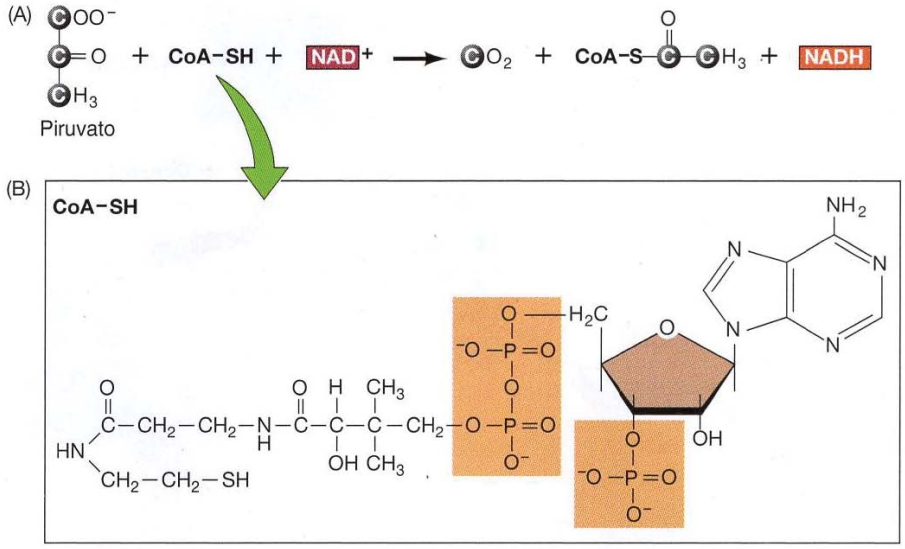


FIGURA 3.3 Descarboxilación oxidativa del piruvato. (A) El piruvato se convierte en CO_2 y acetil-CoA, y se produce en este proceso una molécula de NADH. (B) La coenzima A (CoA-SH) es un transportador general de grupos acetilo activados en diversas reacciones.

oxalacetato. Durante el ciclo, se forma un enlace de alta energía en forma de GTP, que se emplea directamente para promover la síntesis de una molécula de ATP. Además, cada vuelta del ciclo produce tres moléculas de NADH y una molécula reducida de **flavin adenín dinucleótido ($FADH_2$)**, que es otro transportador de electrones en reacciones redox.

El ciclo del ácido cítrico completa la oxidación de glucosa a seis moléculas de CO_2. Se obtienen cuatro moléculas de ATP directamente de cada molécula de glucosa —dos de la glicólisis y dos del ciclo del ácido cítrico (una por cada molécula de piruvato)—. Además, diez moléculas de NADH (dos de la glicólisis, dos de la conversión de piruvato a acetil-CoA, y seis del ciclo del ácido cítrico) y se forman dos moléculas de $FADH_2$. El resto de la energía derivada de la degradación de la glucosa proviene de la reoxidación del NADH y $FADH_2$, con sus electrones siendo transferidos a lo largo de la cadena de transporte de electrones a (finalmente) reducir el O_2 a H_2O. Según se expone en la siguiente sección de este capítulo, la oxidación de NADH produce energía suficiente para activar la síntesis de tres moléculas de ATP, mientras que la oxidación de $FADH_2$ produce dos moléculas de ATP. La oxidación completa de la glucosa da lugar así a un total de 38 moléculas de ATP (4 directamente de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico, 30 de la oxidación de NADH y 4 de la oxidación de $FADH_2$). Sin embargo, en algunas células, esta producción es menor, debido a que las dos moléculas de NADH generadas por glicólisis en el citosol son incapaces de entrar directamente en las mitocondrias. En su lugar, los electrones deben ser transferidos a la mitocondria por medio de un sistema de traslado que puede derivar en que estos electrones entren en la cadena de transporte electrónico en el $FADH_2$. En estos casos, las dos moléculas de NADH obtenidas por glicólisis dan origen a dos, y no tres, moléculas de ATP, con lo cual se reduce la producción total a 36, en lugar de 38, ATP por molécula de glucosa.

Producción de energía a partir de lípidos

La energía en forma de ATP puede obtenerse no sólo de la descomposición de la glucosa, sino también de la degradación de otras moléculas orgánicas, donde la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico vuelven a desempeñar

ANIMACIÓN 3.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a3.2

El ciclo del ácido cítrico. El ciclo del ácido cítrico es la vía central del metabolismo oxidativo y completa la oxidación de la glucosa en seis moléculas de dióxido de carbono.

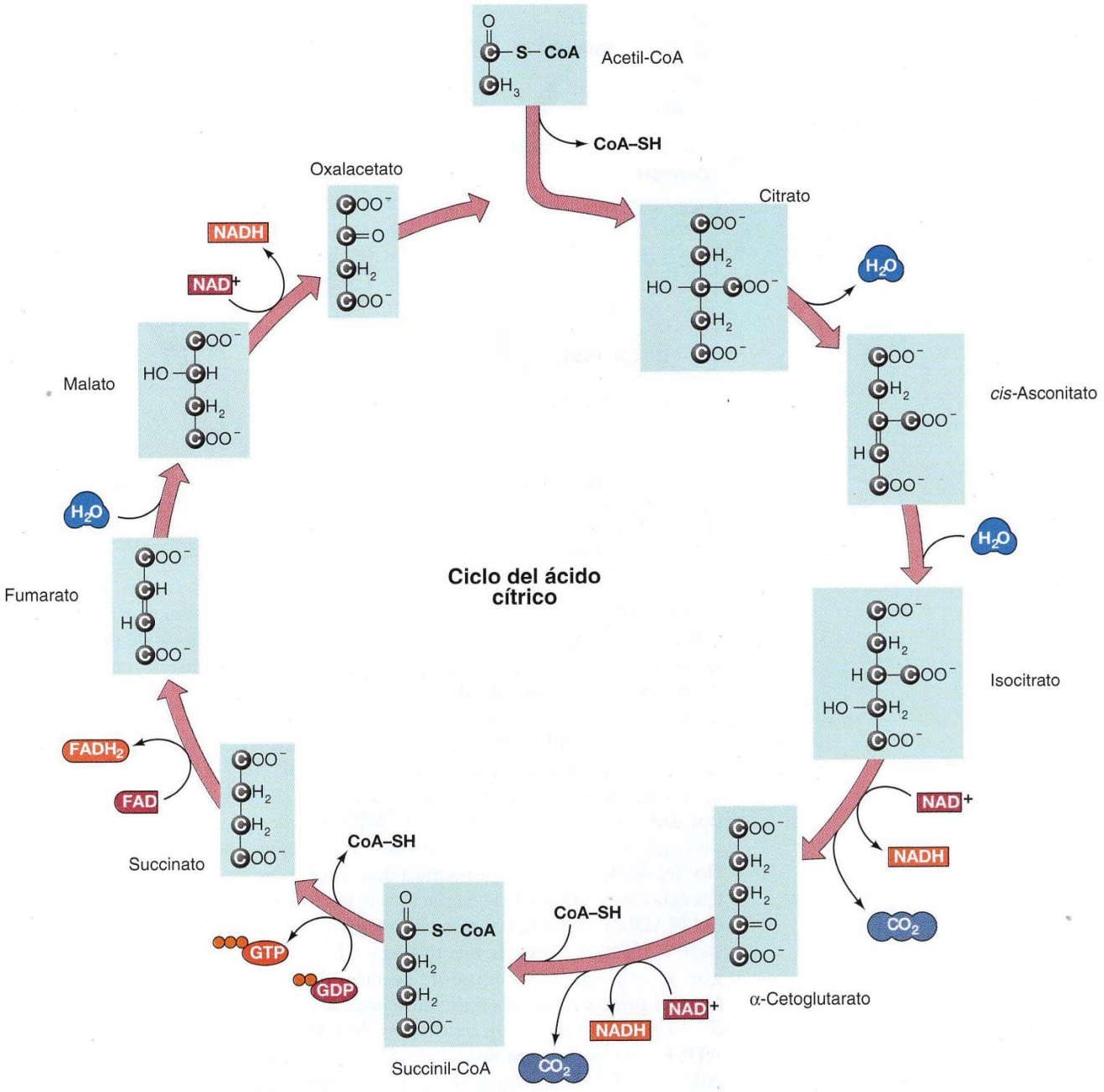


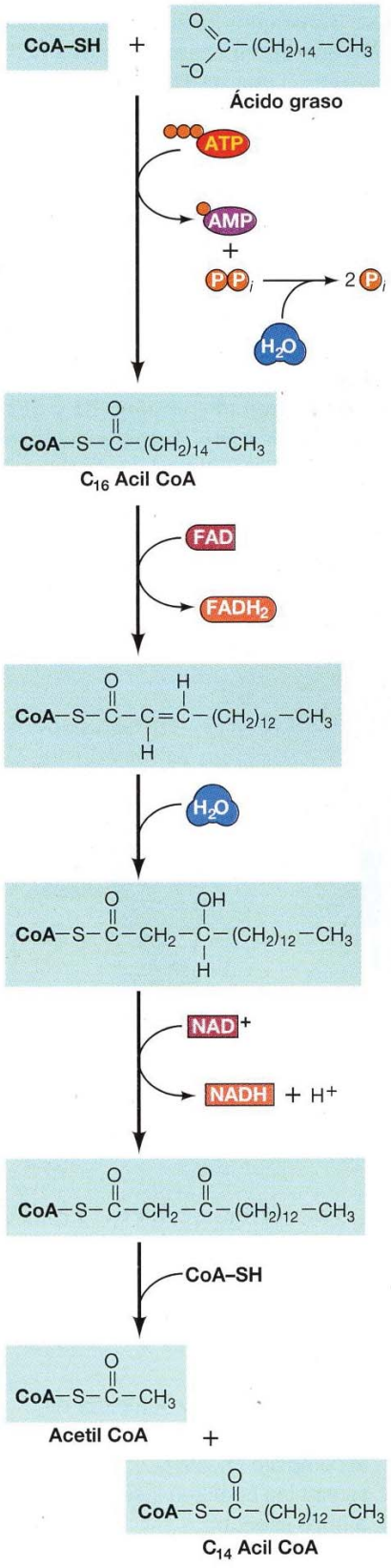
FIGURA 3.4 Ciclo del ácido cítrico. Un grupo acetilo de dos carbonos es transferido del acetil-CoA al oxalacetato, formando citrato. Dos carbonos del citrato son entonces oxidados a CO_2 y se regenera el oxalacetato. Cada vuelta del ciclo produce una molécula de GTP, tres de NADH y una de $FADH_2$.

una función central. Las dos formas principales de almacenamiento de energía dentro de las células son los polisacáridos y los lípidos, que pueden ser degradados por la célula para producir ATP. Los polisacáridos pueden ser degradados a azúcares libres, que son entonces metabolizados por glicólisis y el ciclo de Krebs. Los lípidos, sin embargo, son moléculas todavía más eficaces en el almacenamiento de energía. Debido a que los lípidos están más reducidos que los carbohidratos, consistiendo básicamente en

cadenas hidrocarbonadas, su oxidación produce sustancialmente más energía por peso de material inicial.

Las grasas (triacilgliceroles) son la principal forma de almacenamiento de lípidos. El primer paso en su utilización es su degradación a glicerol y ácidos grasos libres. Cada ácido graso se une a una coenzima A, produciendo un acil-CoA graso a expensas de una molécula de ATP (**Fig. 3.5**). Entonces, los ácidos grasos se degradan paso a paso en un proceso oxidativo, dos carbonos cada vez, produciendo acetil-CoA más un acil-CoA graso con dos carbonos menos. Cada ronda de oxidación también produce una molécula de NADH y otra de $FADH_2$. El acetil-CoA entra entonces en el ciclo del ácido cítrico, y la degradación del resto del ácido graso continúa del mismo modo.

La degradación de un ácido graso de 16 carbonos produce de este modo siete moléculas de NADH, siete de $FADH_2$, y ocho de acetil-CoA. En términos de generación de ATP, esta producción corresponde a 21 moléculas de ATP derivadas de NADH (3 × 7), 14 ATP de $FADH_2$ (2 × 7) y 96 de acetil-CoA (8 × 12). Como se utilizó un ATP para poner en marcha el proceso, la ganancia neta es de 130 ATP por molécula de ácido graso de 16 carbonos. Compárese esta producción con la ganancia neta de 38 ATP por molécula de glucosa. Puesto que el peso molecular de un ácido graso saturado de 16 carbonos es de 256 y el de la glucosa es de 180, la producción de ATP es aproximadamente 2,5 veces mayor por gramo de ácido graso —de ahí la ventaja de los lípidos (grasas) sobre los polisacáridos (azúcares) como moléculas de almacenamiento de energía.



Transporte de electrones y fosforilación oxidativa

La mayor parte de la energía utilizable que se obtiene de la descomposición de los carbohidratos o de los lípidos proviene del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa. Por ejemplo, la descomposición de glucosa por glicólisis y por el ciclo del ácido cítrico produce un total de cuatro moléculas de ATP, diez de NADH y dos de $FADH_2$. Los electrones de NADH y $FADH_2$ son transferidos a continuación a oxígeno molecular, que se acopla a la formación de 34 moléculas más de ATP por fosforilación oxidativa. La transferencia de electrones desde NADH a O_2 libera una gran cantidad de energía libre: $\Delta G^\circ = -52{,}5$ kcal/mol para cada par de electrones transferido. Dado que esta energía puede recuperarse en forma útil, el proceso tiene lugar gradualmente por el paso de electrones a través de una serie de transportadores, para constituir la cadena de transporte de electrones.

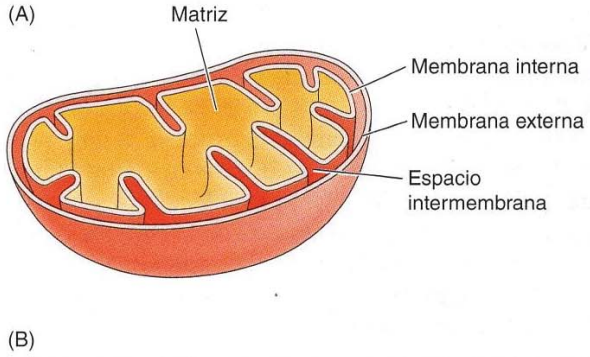
Cadena de transporte de electrones

Los componentes de la **cadena de transporte de electrones** están organizados en cuatro complejos en la membrana plasmática de las bacterias aeróbicas y en la membrana mitocondrial interna de las células eucariotas (**Fig. 3.6**). El NADH se produce a partir del ciclo del ácido cítrico en la matriz mitocondrial. A continuación, los electrones del NADH entran en la cadena de transporte de electrones en el complejo I, que en las células eucariotas consiste en 44 cadenas de polipéptidos. Estos electrones son transferidos inicialmente desde el NADH al mononucleótido flavina y, después, a través de una serie de transportadores de sulfuro de hierro, a la coenzima Q —un proceso que desprende energía con una $\Delta G^{\circ\prime} = -16{,}6$ kcal/mol—. La coen-

FIGURA 3.5 Oxidación de los ácidos grasos. El ácido graso (p. ej., el ácido graso saturado de 16 carbonos palmitato) inicialmente se une a la coenzima A (CoA-SH) a expensas de una molécula de ATP. La degradación del ácido graso continúa con una oxidación secuencial (acoplada a la formación de $FADH_2$ y NADH) y la eliminación de unidades de dos carbonos en forma de acetil CoA.

zima Q (también denominada **ubiquinona**) es una molécula pequeña, liposoluble, que transporta los electrones desde el complejo I, a través de la membrana, hasta el complejo III, que está constituido aproximadamente por 10 polipéptidos. En el complejo III los electrones se transfieren desde el citocromo *b* al citocromo *c* —una reacción que libera energía con una $\Delta G^{\circ\prime}$ = –10,1 kcal/mol—. El **citocromo *c***, una proteína de membrana periférica, unida a la cara externa de la membrana interna, transporta a continuación los electrones al complejo IV (**citocromo oxidasa**), donde finalmente son transferidos al O_2 ($\Delta G^{\circ\prime}$ = –25,8 kcal/mol). La transferencia de electrones que cede en cada uno de estos complejos se acopla a la síntesis de ATP.

Un complejo de proteínas diferente (complejo II), constituido por cuatro polipéptidos, recibe los electrones del succinato, que es un producto intermediario del ciclo del ácido cítrico (**Fig. 3.7**). Estos electrones son transferidos al $FADH_2$, en lugar de al NADH, y después a la coenzima Q. Desde la coenzima Q los electrones se transfieren al complejo III y después al complejo IV, como ya se ha descrito. A diferencia de la transferencia de electrones desde el NADH a la coenzima Q en el complejo I, la transferencia de electrones desde el $FADH_2$ a la coenzima Q no lleva asociada una disminución



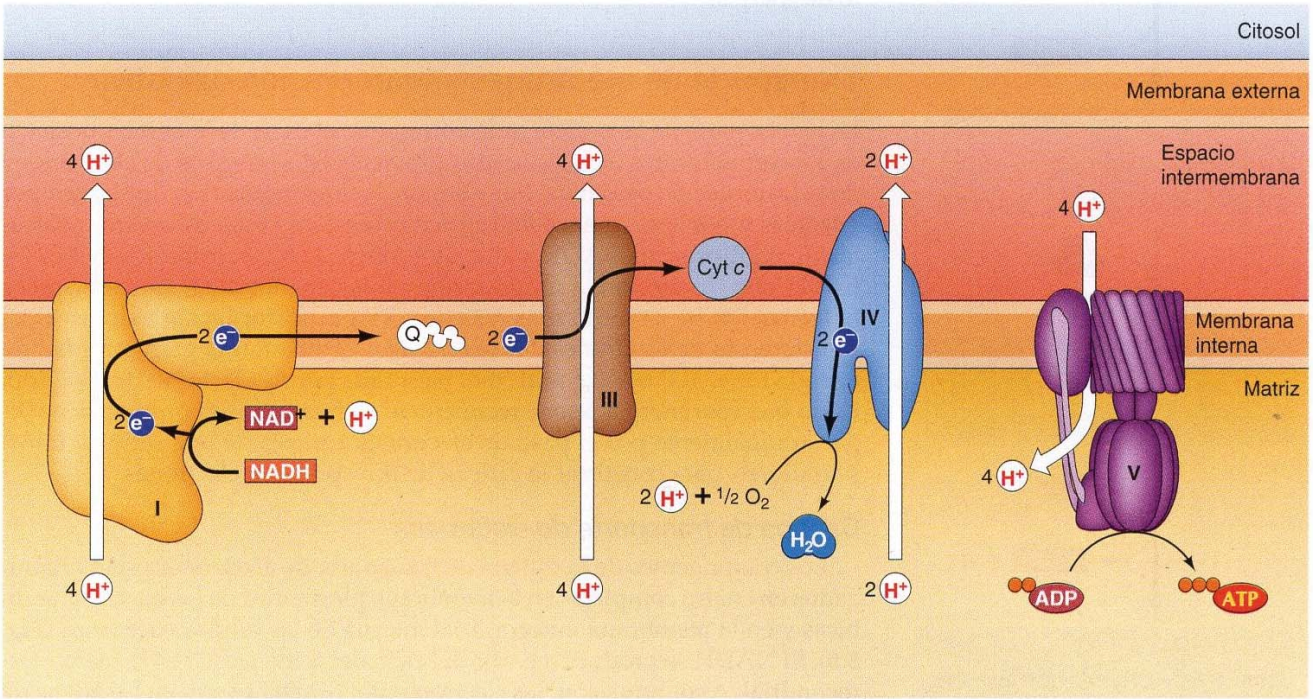


FIGURA 3.6 Cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. (A) Las mitocondrias están unidas por un sistema de doble membrana que consiste en una membrana interna y otra externa. Los pliegues de la membrana interna (crestas) se extienden a la matriz. El NADH se produce a partir del ciclo de Krebs en la matriz. (B) Los electrones del NADH entran en la cadena de transporte de electrones en el complejo I. A continuación, los electrones son transferidos al complejo III por la coenzima Q, y después al complejo IV por el citocromo *c*, donde se transfieren a O_2. Las transferencias de electrones en los complejos I, III y IV están asociadas con una disminución de la energía libre, que se utiliza para bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana. Se establece así un gradiente de protones a través de la membrana interna. La energía almacenada en el gradiente de protones se utiliza entonces para inducir la síntesis de ATP cuando los protones retroceden a la matriz a través del complejo V.

◆ La rotenona, un inhibidor de la transferencia electrónica desde el complejo I hasta la coenzima Q, se emplea como un insecticida de amplio espectro.

◆ Adicionalmente a su papel en el transporte electrónico, el citocromo *c* es un regulador clave en la muerte celular programada en las células de mamífero (analizado en el Cap. 18).

significativa de la energía libre, por lo que no está acoplada a la síntesis de ATP. Por tanto, el paso de los electrones derivados del $FADH_2$ a través de la cadena de transporte de electrones sólo rinde energía libre en los complejos III y IV.

La energía libre derivada del paso de electrones a través de los complejos I, III y IV se obtiene al acoplarse con la síntesis de ATP por **fosforilación oxidativa**. Es importante destacar que el mecanismo por el que la energía derivada de estas reacciones de transporte de electrones se acopla a la síntesis de ATP, es fundamentalmente diferente de la síntesis de ATP durante la glicólisis o el ciclo del ácido cítrico. En estos últimos, un fosfato rico en energía se transfiere directamente al ADP desde otro sustrato, en una reacción que libera energía. Por ejemplo, en la reacción final de la glicólisis, el fosfato rico en energía del fosfoenol-piruvato es transferido al ADP, dando lugar a piruvato más ATP (véase Fig. 3.2). Esta transferencia directa de grupos fosfato de alta energía no tiene lugar durante el transporte de electrones. En su lugar, la energía derivada del transporte de electrones está acoplada a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía potencial almacenada en este gradiente se obtiene mediante un quinto complejo proteínico que acopla el flujo, energéticamente favorable, de los protones a través de la membrana, a la síntesis de ATP.

Acoplamiento quimiosmótico

El mecanismo de acoplamiento del transporte de electrones a la generación de ATP, el **acoplamiento quimiosmótico**, es un ejemplo significativo de la relación entre estructura y función en la biología celular. La hipótesis del

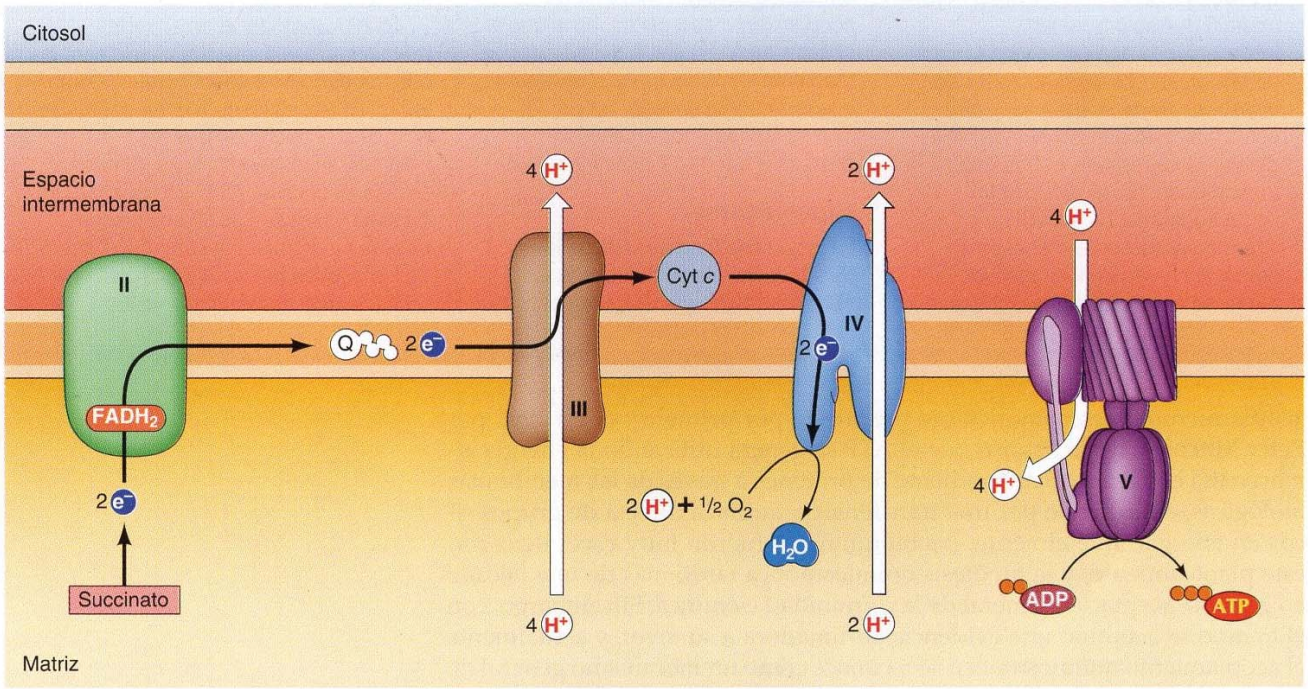


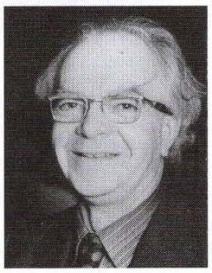
FIGURA 3.7 Transporte de electrones desde el $NADH_2$. Los electrones procedentes del succinato entran en la cadena transportadora de electrones a través del $FADH_2$ en el complejo II. A continuación son transferidos al coenzima Q y transportados a lo largo del resto de la cadena transportadora de electrones como se describió en la Figura 3.6. La transferencia de electrones desde el $FADH_2$ a la coenzima Q no lleva asociada una disminución significativa de la energía libre, por lo que en el complejo II no se bombean protones a través de la membrana y la energía libre se produce solo para los complejos III y IV.

EXPERIMENTO CLAVE

Teoría quimiosmótica

Acoplamiento de la fosforilación a la transferencia de electrones e hidrógeno mediante un mecanismo de tipo quimiosmótico

Peter Mitchell
University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland
Nature, 1961, Volumen 191, págs. 144-148



Peter Mitchell

Contexto

En los años 50 ya se había establecido claramente que en la fosforilación oxidativa intervenía la transferencia secuencial de electrones a través de una serie de transportadores hasta el oxígeno molecular. Pero permanecía siendo un misterio cómo se convertía en ATP la energía derivada de estas reacciones de transferencia de electrones. Lo más obvio era pensar que el ADP se convertía en ATP mediante la transferencia directa de grupos fosfato ricos en energía desde algún otro intermediario, como se sabía que ocurría durante la glicólisis. Así, se postuló que se producían intermediarios ricos en energía como consecuencia de las reacciones de transferencia de electrones, y que estos intermediarios posteriormente dirigían la síntesis de ATP mediante la transferencia del grupo fosfato.

La búsqueda de estos intermediarios ricos en energía se convirtió en uno de los objetivos fundamentales de la investigación durante los años 50 y 60. Pero a pesar de muchas primicias falsas, no se encontraron tales intermediarios. Además, había varios aspectos de la fosforilación oxidativa que eran difíciles de encajar con la hipótesis ortodoxa de que la síntesis de ATP estaba dirigida simplemente por la transferencia de un grupo fosfato. Concretamente, la fosforilación estaba estrechamente asociada a las membranas y se inhibía por diversos compuestos que alteraban la estructura de la membrana. Estas consideraciones llevaron a Peter Mitchell a proponer un mecanismo fundamentalmente diferente de acoplamiento energético, en el que la síntesis de ATP estaba dirigida por un gradiente electroquímico a través de una membrana en lugar de por los intermediarios ricos en energía buscados por otros investigadores.

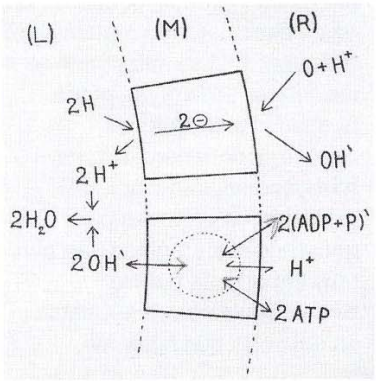
Experimentos

La propuesta fundamental de la hipótesis quimiosmótica era que el «intermediario» que acoplaba el transporte de electrones a la síntesis de ATP era un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Mitchell postuló que tal gradiente estaba producido por el transporte de electrones, y que el flujo retrógrado de los protones a través de la membrana en la dirección energéticamente favorable se acoplaba a la síntesis de ATP (véase figura).

La hipótesis del acoplamiento quimiosmótico explicaba claramente la falta de éxito en la identificación de un intermediario químico rico en energía, así como el hecho de que se necesitaran las membranas intactas para la síntesis de ATP. Es más, fue un concepto radical que se enfrentó al dogma bioquímico de la época. En uno de los últimos párrafos del artículo de 1961, Mitchell asumió una visión

acoplamiento quimiosmótico fue propuesta por primera vez en 1961 por Peter Mitchell, quien sugirió que el ATP se genera utilizando la energía almacenada en forma de un gradiente de protones a través de las membranas biológicas, en lugar de por una transferencia química directa de grupos ricos en energía. Inicialmente, los bioquímicos fueron muy escépticos con este planteamiento, y la hipótesis quimiosmótica tardó más de una década en ganar la aceptación general de la comunidad científica. Sin embargo, con el tiempo se acumuló una evidencia abrumadora a su favor, y actualmente el acoplamiento quimiosmótico se reconoce como un mecanismo general de generación de ATP, que interviene no sólo en las mitocondrias sino también en los cloroplastos y en las bacterias, donde se genera ATP mediante un gradiente de protones a través de la membrana plasmática. La hipótesis fundamental del acoplamiento quimiosmótico reside en que, al igual que es posible utilizar ATP para activar el transporte activo de moléculas pequeñas en contra de un gradiente de concentración (véase Fig. 2.38), la reacción inversa, el transporte favorable energéticamente de moléculas pequeñas (p. ej.,

EXPERIMENTO CLAVE



Representación de Mitchell del acoplamiento quimiosmótico entre un sistema de transporte de electrones (en la parte superior) y un sistema generador de ATP (en la parte inferior) en una membrana (M) que delimita una fase acuosa L en un medio acuoso R.

filosófica de su propuesta revolucionaria:

> *En las ciencias exactas, causa y efecto no son más que acontecimientos secuenciales. Actualmente los bioquímicos aceptan la idea de que el metabolismo es la causa del transporte de membrana. La tesis subyacente a la hipótesis formulada aquí es que si los procesos que llamamos metabolismo y transporte representan acontecimientos en una secuencia, el metabolismo no sólo puede ser la causa del transporte sino que también el transporte puede ser la causa del metabolismo.*

Impacto

La hipótesis de Mitchell fue acogida con escepticismo y fue objeto de un agrio debate durante más de una década. Sin embargo, la gran cantidad de evidencias que apoyaban esta hipótesis, obtenidas por Mitchell y sus colaboradores así como por otros investigadores, finalmente condujeron a la aceptación general de la hipótesis quimiosmótica —conocida a partir de entonces como teoría quimiosmótica—. Ahora es aceptada no sólo como la base para la generación de ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, sino también para el transporte dependiente de energía de diversas moléculas a través de las membranas celulares.

El trabajo de Mitchell fue reconocido con el Premio Nobel en 1978. La conferencia que pronunció en esa ocasión comenzaba de la siguiente manera:

> *Aunque me hubiera gustado que el fundamento quimiosmótico del metabolismo vectorial y de la transferencia de energía biológica llegara a ser algún día generalmente aceptado, hubiera sido presuntuoso por mi parte esperar que eso ocurriera. ¿No fue Max Planck quien comentó que una idea científica nueva no triunfa porque convence a sus oponentes, sino porque sus oponentes se acaban muriendo? El hecho de que lo que empezó llamándose la hipótesis quimiosmótica haya sido ahora proclamado como la teoría quimiosmótica... me ha sorprendido y me ha encantado, particularmente porque aquéllos que fueron anteriormente mis oponentes más competentes aún están en la etapa más importante de sus vidas científicas.*

protones) a favor de un gradiente de concentración, puede utilizarse para activar la síntesis de ATP.

El transporte de electrones a través de los complejos I, III y IV está acoplado al transporte de protones fuera del interior de la mitocondria (véase Fig. 3.6). Por tanto, las reacciones del transporte de electrones que liberan energía están acopladas a la transferencia de protones desde la matriz al espacio intermembrana, lo que establece un gradiente de protones a través de la membrana interna. Los complejos I y IV parece que actúan como bombas de protones, que tranfieren protones a través de la membrana como consecuencia de cambios conformacionales inducidos por el transporte de electrones. En el complejo III, los protones son transportados a través de la membrana mediante la coenzima Q, que acepta protones de la matriz en los complejos I y II y los libera en el espacio intermembrana en el complejo III. Los complejos I y III transfieren cuatro protones cada uno a través de la membrana por cada par de electrones. En el complejo IV, por cada par de electrones se bombean dos protones a través de la membrana y otros dos protones se combinan con el O_2 para formar H_2O en la matriz. Así pues, en cada uno de estos tres complejos el equivalente a cuatro protones por par de electrones es transportado fuera de las mitocondrias. Esta transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial desempeña un papel fundamental en la conversión de la energía obtenida de las reacciones de oxidación/reducción del transporte de electrones en la energía potencial almacenada en un gradiente de protones.

Debido a que los protones son partículas cargadas eléctricamente, la energía potencial almacenada en el gradiente de protones es de naturaleza tanto eléctrica como química. El componente eléctrico corresponde a la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna, siendo la matriz de la mitocondria negativa y el espacio intermembrana positivo. La energía libre correspondiente viene dada por la ecuación:

$$\Delta G = -F\Delta V$$

donde F es la constante de Faraday y ΔV es el potencial de membrana. La energía libre adicional que corresponde a la diferencia en la concentración de protones a través de la membrana, viene dada por la ecuación:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o}$$

donde $[H^+]_i$ y $[H^+]_o$ se refieren a la concentración de protones dentro y fuera de la mitocondria, respectivamente.

En las células metabólicamente activas, los protones son bombeados fuera de la matriz de tal manera que el gradiente de protones a través de la membrana interna corresponde aproximadamente a una unidad de pH, o a una concentración de protones en el interior de la mitocondria diez veces menor (**Fig. 3.8**). Por tanto, el pH de la matriz mitocondrial es aproximadamente 8, comparado con el pH neutro (aproximadamente 7) del citosol y del espacio intermembrana. Este gradiente también genera un potencial eléctrico de aproximadamente 0,14 V a través de la membrana, siendo la matriz negativa. Tanto el gradiente de pH como el potencial eléctrico dirigen el flujo de protones desde el citosol de vuelta a la matriz, por lo que su combinación supone un **gradiente electroquímico** a través de la membrana mitocondrial interna, con una ΔG correspondiente de alrededor de –5 kcal/mol por protón.

Debido a que la bicapa fosfolipídica es impermeable a los iones, los protones sólo pueden atravesar la membrana a través de un canal de proteínas. Esta restricción permite aprovechar la energía del gradiente electroquímico

◆ Todos los mamíferos recién nacidos (y determinados mamíferos adultos) contienen un tejido especializado denominado grasa parda. Las mitocondrias de las células de la grasa parda contienen una proteína desacopladora denominada termogenina, que emplea el gradiente de protones para generar calor. La grasa parda es muy importante para la termorregulación en neonatos y en animales que hibernan.

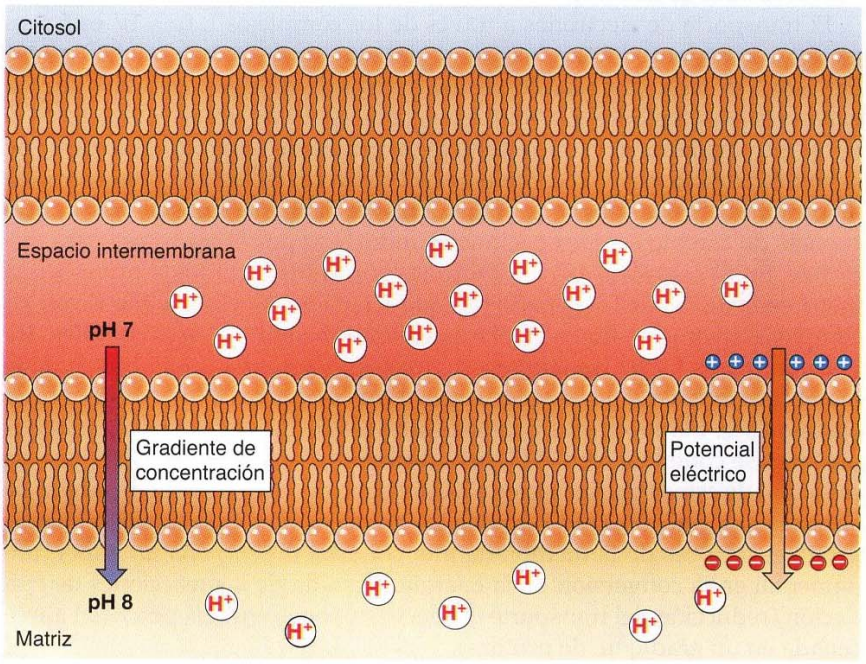


FIGURA 3.8 Naturaleza electroquímica del gradiente de protones. Debido a que los protones están cargados positivamente, el gradiente de protones que se establece a través de la membrana mitocondrial interna tiene un componente tanto químico como eléctrico. El componente químico es el gradiente de la concentración de protones, o de pH, que se corresponde con una concentración de protones aproximadamente diez veces superior en el lado citosólico de la membrana mitocondrial interna (una diferencia de una unidad de pH). Además, hay un potencial eléctrico a través de la membrana, debido al incremento neto de la carga positiva en el lado citoplásmico.

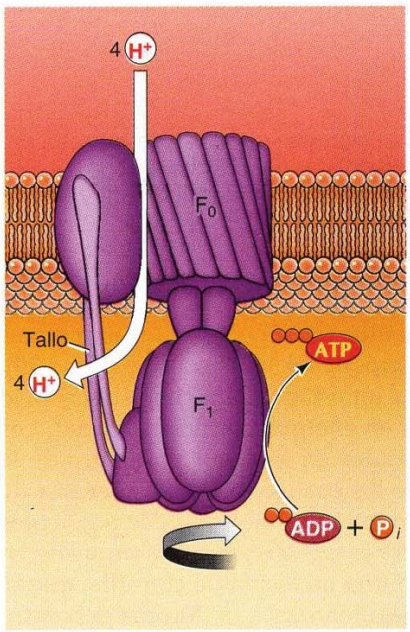
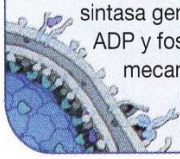


FIGURA 3.9 Estructura de la ATP sintetasa. La ATP sintetasa mitocondrial (complejo V) está constituida por dos subunidades, F_0 y F_1, que están unidas por un tallo estrecho. F_0 atraviesa la bicapa lipídica, formando un canal a través del cual los protones pueden atravesar la membrana. Una subunidad de F_1 también gira y recoge la energía libre derivada del movimiento de protones a favor del gradiente electroquímico catalizando la síntesis de ATP.

◆ Otro ejemplo de un motor rotacional electroquímico es el flagelo bacteriano.

VÍDEO 3.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v3.1



La ATP sintasa en acción. La ATP sintasa genera ATP a partir de ADP y fosfato mediante un mecanismo rotacional que gira unas 150 veces por segundo.

y que sea convertida en ATP, mediante la acción del quinto complejo que interviene en la fosforilación oxidativa, el complejo V, o **ATP sintetasa** (véase Fig. 3.6). La ATP sintetasa está constituida por dos componentes estructuralmente diferentes, F_0 y F_1, que están unidos por un tallo estrecho (**Fig. 3.9**). La porción F_0 es un motor de energía eléctrica que atraviesa la membrana interna y proporciona un canal a través del cual los protones fluyen de vuelta desde el espacio intermembrana a la matriz. El retorno de los protones a la matriz, proceso energéticamente favorable, se acopla a la síntesis de ATP mediante el giro de una subunidad de F_1, que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP e iones fosfato (P_i). Estudios estructurales detallados han establecido el mecanismo de acción de la ATP sintetasa, que implica el acoplamiento mecánico entre las subunidades F_0 y F_1. Concretamente, el flujo de protones a través de F_0 determina la rotación de F_1, que actúa como un motor de rotación que dirige la síntesis de ATP.

Parece que se requiere el flujo de vuelta a través de la membrana de cuatro protones a través de F_0 para dirigir la síntesis de una molécula de ATP por F_1, lo que concuerda con que cada una de las transferencias de protones en los complejos I, III y IV, contribuye con la suficiente energía libre al gradiente de protones como para dirigir la síntesis de una molécula de ATP. De esta manera, la oxidación de una molécula de NADH da lugar a la síntesis de tres moléculas de ATP, mientras que la oxidación de $FADH_2$, que entra en la cadena de transporte de electrones en el complejo II, genera sólo dos moléculas de ATP.

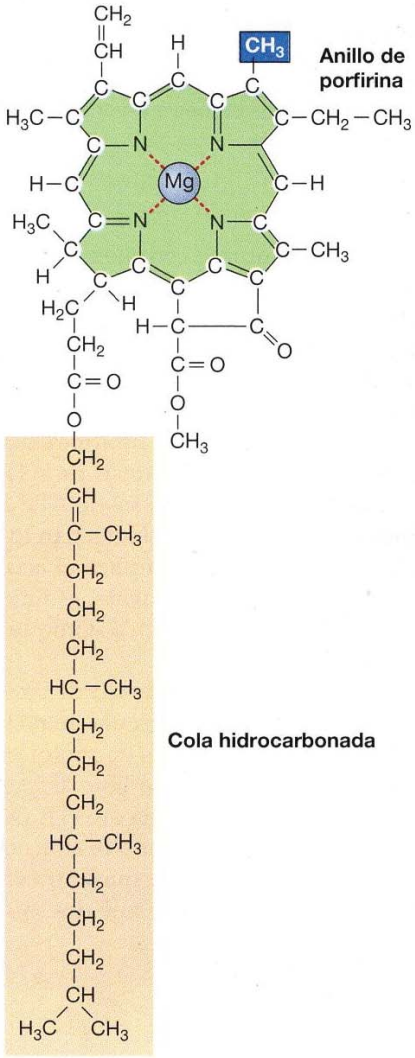
Fotosíntesis

La generación de energía a partir de la oxidación de carbohidratos y lípidos depende de la degradación de compuestos orgánicos preformados. La energía necesaria para la síntesis de estos compuestos se deriva en último término de la luz solar, que se recoge y emplea por las plantas y las bacterias fotosintetizantes para promover la síntesis de carbohidratos. Al convertir la energía de la luz solar en una forma utilizable de energía química, la fotosíntesis es la última fuente de la energía metabólica en los sistemas biológicos.

La ecuación global de la fotosíntesis puede escribirse como sigue:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

El proceso es mucho más complejo, sin embargo, y tiene lugar en dos etapas distintas. En la primera, llamada **reacciones luminosas**, la energía absorbida de la luz solar promueve la síntesis de ATP y NADPH (una coenzima similar al NADH), acoplada a la oxidación de H_2O a O_2. El ATP y el NADPH generados en las reacciones luminosas promueven la síntesis de carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O en un segundo conjunto de reacciones, llamadas **reacciones oscuras** porque no requieren luz solar. En células eucariotas, tanto las reacciones luminosas como las oscuras tienen lugar en los cloroplastos.



CH_3 en clorofila *a*
CHO en clorofila *b*

FIGURA 3.10 Estructura de la clorofila. Las clorofilas consisten en estructuras de anillos porfirínicos ligadas a colas hidrocarbonadas. La clorofila *a* (en la imagen) se diferencia de la clorofila *b* en un único grupo funcional del anillo de porfirina.

Transporte de electrones

La luz solar es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, los más abundantes de los cuales son, en las plantas superiores, las **clorofilas** (**Fig. 3.10**). La absorción de luz excita un electrón a un estado energético superior, lo cual convierte la energía de la luz solar en energía química potencial. Los pigmentos fotosintéticos están organizados en **fotocentros** dentro de la membrana de cloroplastos, cada uno de los cuales contiene centenares de moléculas de pigmentos (**Fig. 3.11**). Las numerosas moléculas de pigmentos de cada fotocentro actúan a modo de antenas que absorben luz y transfieren la energía de sus electrones excitados a una molécula de clorofila, que se comporta como un centro de reacción. Seguidamente, la clorofila del centro de reacción transfiere sus electrones de alta energía a una molécula aceptora en una cadena de transporte de electrones. Los electrones de alta energía son transferidos a continuación a través de una serie de transportadores de membrana, en acoplamiento con la síntesis de ATP y NADPH (**Fig. 3.12**).

En los vegetales, las proteínas que intervienen en la fase lumínica de la fotosíntesis se organizan en cinco complejos en la membrana del tilacoide (**Fig. 3.13**). Dos de estos complejos son fotosistemas (**fotosistemas I y II**), en los que la luz se absorbe y se transfiere a las clorofilas del centro de reacción.

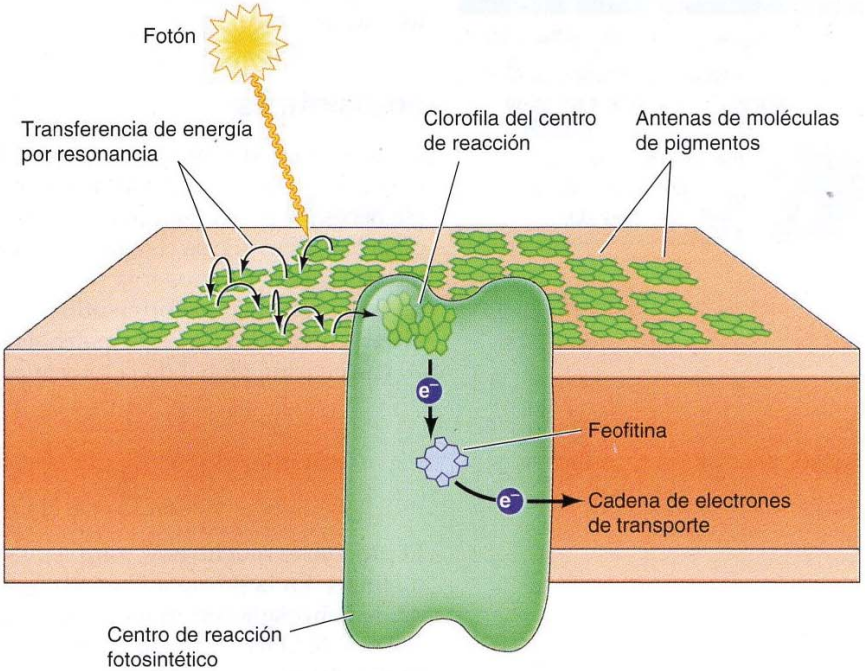


FIGURA 3.11 Organización de un fotocentro. Cada fotocentro está constituido por cientos de antenas de moléculas de pigmentos, que absorben los fotones y transfieren energía a la clorofila del centro de reacción. La clorofila del centro de reacción transfiere a continuación su electrón excitado a un aceptor (feofitina) en la cadena de transporte de electrones.

ANIMACIÓN 3.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a3.3

Reacciones lumínicas. Durante las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, la energía absorbida de la luz solar dirige la síntesis de ATP y NADPH, acoplada a la oxidación de H_2O en O_2.

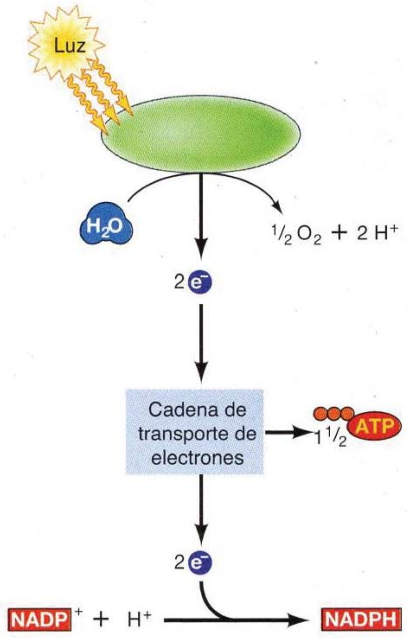


FIGURA 3.12 Reacciones luminosas de la fotosíntesis. La energía de la luz solar se emplea para escindir el H_2O a O_2. Entonces los electrones de alta energía derivados de este proceso se transportan a través de una serie de transportadores y son empleados para convertir el $NADP^+$ en NADPH. La energía derivada de las reacciones de transporte de electrones también promueve la síntesis de ATP.

Los electrones de alta energía generados como consecuencia de la absorción de la luz son entonces transferidos a través de una serie de transportadores tanto en los fotosistemas como en un tercer complejo de proteínas, el **complejo citocromo *bf***. Al igual que sucede en las mitocondrias, la transferencia de electrones está acoplada a la transferencia de protones a la luz del tilacoide, estableciéndose así un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. La energía almacenada en este gradiente de protones se obtiene posteriormente por un cuarto complejo de proteínas de la membrana del tilacoide, la ATP sintetasa, que (al igual que la enzima mitocondrial) acopla un flujo retrógrado de protones, a través de la membrana, a la síntesis de ATP.

(A)

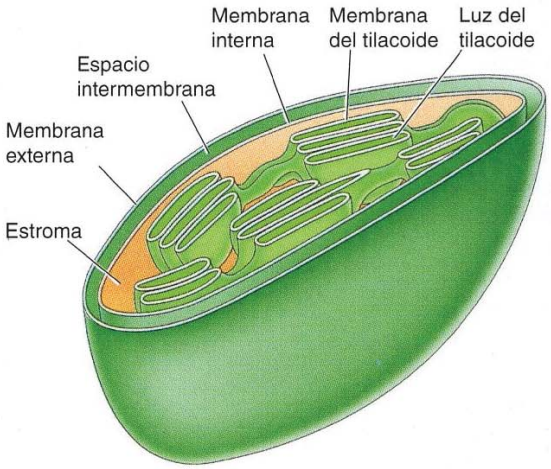
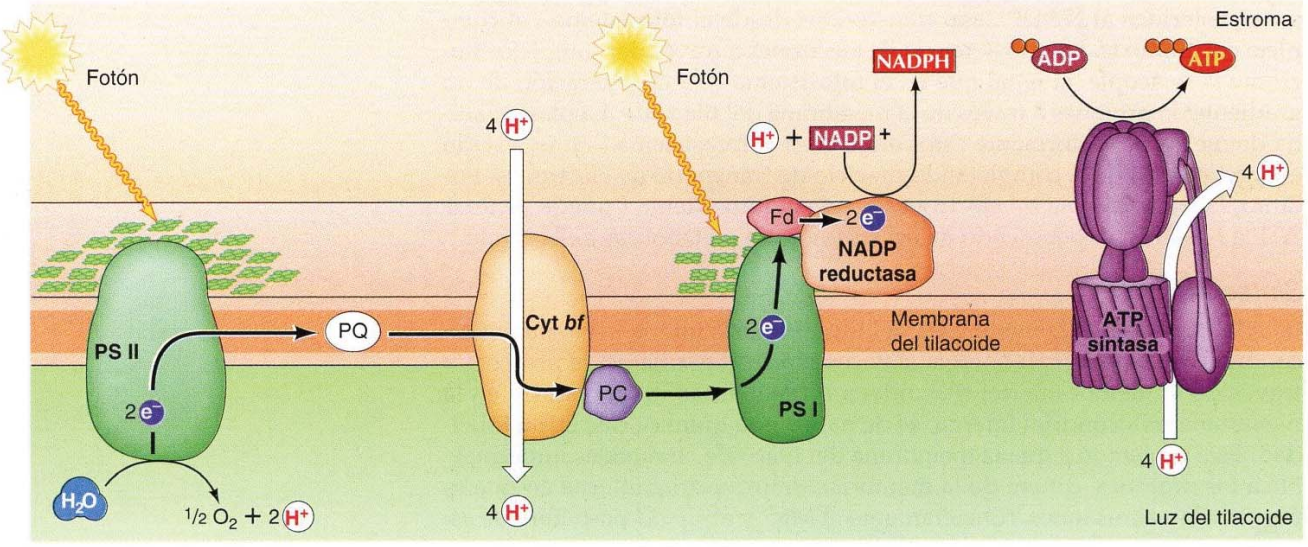


FIGURA 3.13 Transporte de electrones y síntesis de ATP durante la fotosíntesis. (A) Además de las membranas interna y externa de la envoltura, los cloroplastos contienen un tercer sistema de membrana interna: la membrana del tilacoide. Estas membranas dividen los cloroplastos en tres compartimentos internos (espacio intermembrana, estroma y luz del tilacoide). (B) En el transporte de electrones y en la síntesis de ATP y NADPH intervienen cuatro complejos proteicos en la membrana del tilacoide. Los fotones son absorbidos por complejos de moléculas de pigmento asociadas con los fotosistemas I y II (PS I y PS II). En el fotosistema II, la energía derivada de la absorción de fotones se utiliza para escindir una molécula de agua en la luz del tilacoide. A continuación los electrones son transportados por la plastoquinona (PQ) al complejo citocromo *bf*, donde pasan a un estado energético inferior y se bombean protones al interior de la luz del tilacoide. Los electrones son transferidos después al fotosistema I mediante la plastocianina (PC). En el fotosistema I, la energía derivada de la absorción de la luz vuelve a generar electrones de alta energía, que son transferidos a la ferredoxina (Fd) y se utilizan para reducir el $NADP^+$ a NADPH en el estroma. La ATP sintetasa utiliza después la energía almacenada en el gradiente de protones para convertir el ADP en ATP.

(B)



Una diferencia importante entre el transporte de electrones en los cloroplastos y en las mitocondrias es que la energía derivada de la luz solar durante la fotosíntesis no sólo es convertida en ATP sino que también se utiliza para generar el NADPH requerido para convertir el CO_2 en carbohidratos. Esto se consigue utilizando dos fotosistemas diferentes en la fase lumínica de la fotosíntesis, uno para generar ATP y el otro para generar NADPH. Los electrones se transfieren de forma secuencial entre los dos fotosistemas, interviniendo el fotosistema I para generar NADPH y el fotosistema II para generar ATP.

◆ Diversos compuestos que se unen al fotosistema II e inhiben la transferencia de electrones se utilizan como herbicidas para el control de malas hierbas.

La vía del flujo de electrones comienza en el fotosistema II, donde la energía obtenida de la absorción de fotones se utiliza para escindir las moléculas de agua en oxígeno molecular y protones, donde la liberación de protones a partir de H_2O establece un gradiente de protones a través de la membrana (véase Fig. 3.13). Los electrones de alta energía derivados de este proceso son transferidos a través de una serie de transportadores a la plastoquinona, un vehículo liposoluble similar a la coenzima Q (ubiquinona) de las mitocondrias. La plastoquinona transporta electrones desde el fotosistema II al complejo citocromo *bf*, dentro del cual los electrones son transferidos a plastocianina (una proteína de membrana periférica) y cuatro protones adicionales son bombeados a la luz del tilacoide. El transporte de electrones a través del fotosistema II se suma así al establecimiento de un gradiente de protones, que activa la síntesis quimiostática de ATP.

A partir del complejo citocromo *bf*, los electrones son transportados por la plastocianina al fotosistema I, donde la absorción de fotones adicionales genera nuevamente electrones de alta energía. Sin embargo, el fotosistema I no actúa como una bomba de protones; al contrario, utiliza estos electrones de alta energía para reducir $NADP^+$ a NADPH. La clorofila del centro de reacción del fotosistema I transfiere sus electrones excitados a través de una serie de transportadores a la ferredoxina, una pequeña proteína en el exterior de la membrana del tilacoide. La ferredoxina puede formar complejo con la enzima **NADP reductasa**, que transfiere electrones desde la ferredoxina a $NADP^+$, para generar NADPH. El paso de electrones a través de los fotosistemas II y I genera así ATP y NADPH, que son utilizados por las enzimas en el ciclo de Calvin para convertir CO_2 en carbohidratos (como se analiza más adelante).

Hay una segunda ruta de transporte de electrones, denominada **flujo cíclico de electrones**. En el flujo cíclico de electrones, la energía de la luz obtenida en el fotosistema I se utiliza para la síntesis de ATP en lugar de para la síntesis de NADPH (**Fig. 3.14**). Los electrones ricos en energía en lugar de ser transferidos al $NADP^+$, son transferidos desde el fotosistema I al complejo citocromo *bf*. La transferencia de electrones a través del complejo citocromo *bf* se acopla, al igual que en el fotosistema II, a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. La plastocianina devuelve posteriormente estos electrones al fotosistema I en un estado energético más bajo, completando un ciclo de transporte de electrones. Por tanto, la transferencia de electrones desde el fotosistema I puede generar ATP o NADPH, dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula.

Síntesis de ATP

La ATP sintetasa de la membrana del tilacoide es similar a la enzima mitocondrial. Sin embargo, la energía almacenada en el gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide, a diferencia de lo que ocurre en la membrana mitocondrial interna, es de naturaleza química casi en su totalidad. Esto es debido a que la membrana del tilacoide, aunque es impermeable a los protones, difiere de la membrana mitocondrial interna en que es permeable a otros iones, concretamente al Mg^{2+} y al Cl^-. El paso libre de es-

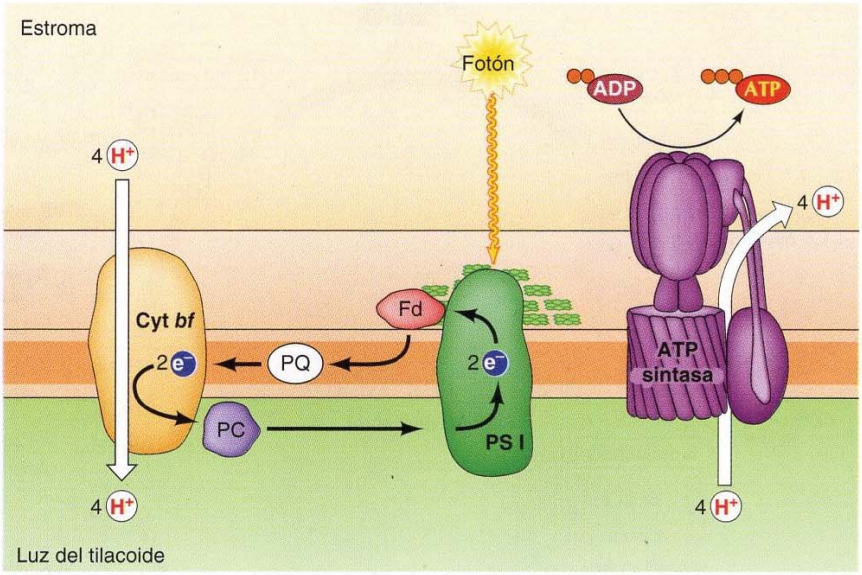


FIGURA 3.14 Ruta del flujo cíclico de electrones. La energía luminosa absorbida en el fotosistema I (PS I) se utiliza para la síntesis de ATP en lugar de para la síntesis de NADPH. Los electrones de alta energía generados por la absorción de protones se transfieren mediante la ferredoxina (Fd) y plastoquinona (PQ) al complejo del citocromo *bf* en vez de al $NADP^+$. En el complejo del citocromo *bf*, los electrones pasan a un estado de menor energía y se bombean protones a la luz del tilacoide. A continuación, la plastocianina (PC) devuelve los electrones al fotosistema I. La ATP-sintasa acopla la síntesis de ATP con el flujo de protones de la luz tilacoidea al estroma.

tos iones neutraliza el componente de voltaje del gradiente de protones, por lo que la energía derivada de la fotosíntesis se conserva principalmente como una diferencia en la concentración de protones (pH) a través de la membrana del tilacoide. Sin embargo, puesto que la luz del tilacoide es un compartimento cerrado, esta diferencia en la concentración de protones puede ser bastante grande, con una variación entre el estroma y la luz del tilacoide de más de tres unidades de pH. Dada la magnitud de este diferencial de pH, la energía libre total almacenada a través de la membrana del tilacoide es similar a la almacenada a través de la membrana mitocondrial interna.

Por cada par de electrones transportados, en el fotosistema II se transfieren dos protones a través de la membrana del tilacoide, y de dos a cuatro protones en el complejo citocromo *bf*. Puesto que se necesitan cuatro protones para dirigir la síntesis de una molécula de ATP, el paso de cada par de electrones a través de los fotosistemas I y II mediante el flujo no cíclico de electrones rinde entre 1 y 1,5 moléculas de ATP. El flujo cíclico de electrones tiene un rendimiento inferior, entre 0,5 y 1 moléculas de ATP por cada par de electrones.

Síntesis de glucosa

En las reacciones oscuras, que tiene lugar en el estroma del cloroplasto, el ATP y el NADPH producidos en las reacciones luminosas promueven la síntesis de carbohidratos a partir del CO_2 y H_2O. Las moléculas de CO_2 se añaden una a una a un ciclo de reacciones —conocidas como el **ciclo de Calvin**, en honor a su descubridor, Melvin Calvin— que conduce a la formación de carbohidratos (**Fig. 3.15**). En total, el ciclo de Calvin consume 18 mo-

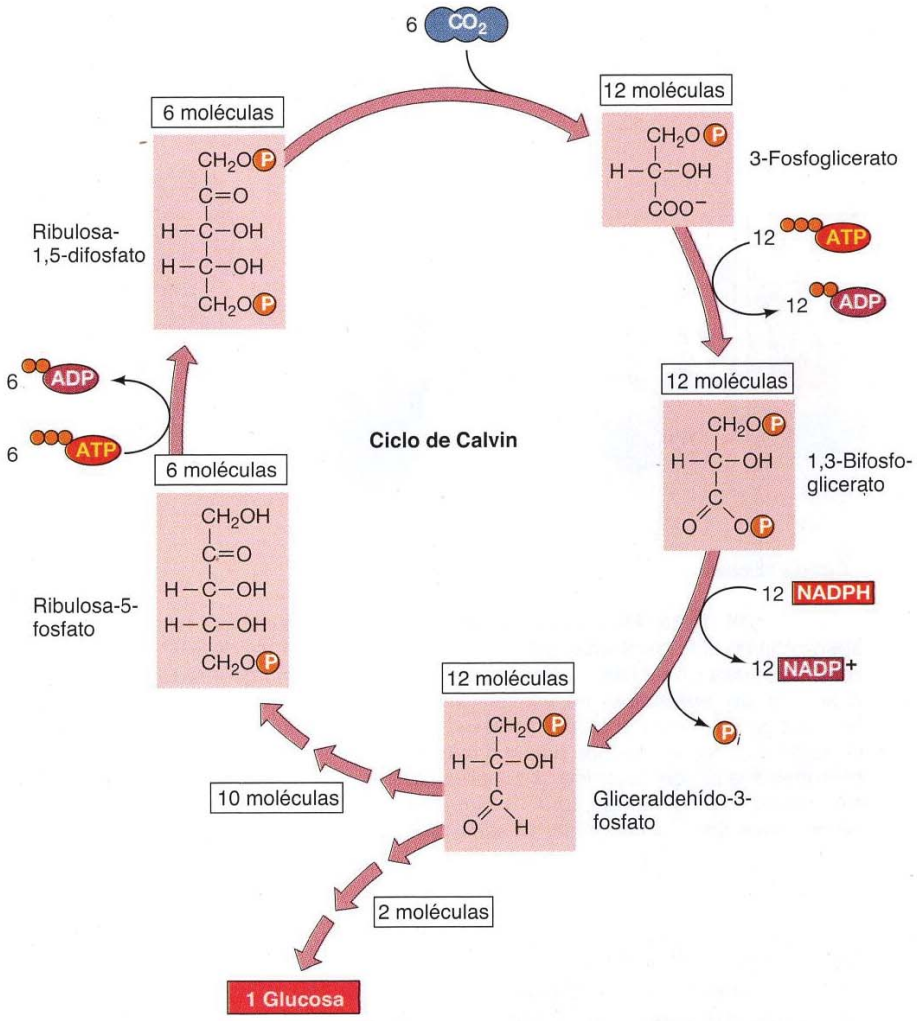


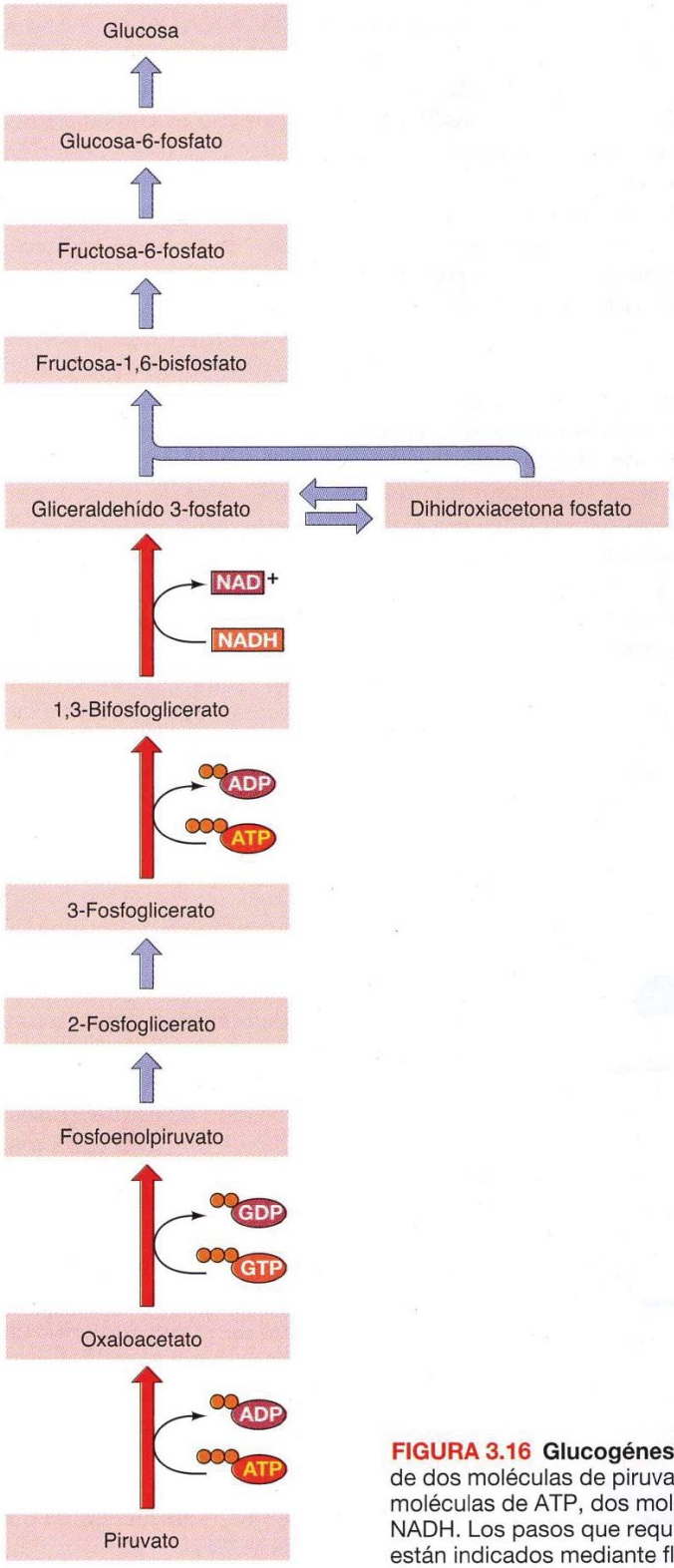
FIGURA 3.15 Ciclo de Calvin. Se muestra aquí la síntesis de una molécula de glucosa a partir de seis moléculas de CO_2. Cada molécula de CO_2 se añade a la ribulosa-1,5-difosfato para producir dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Estas seis moléculas de CO_2 conducen, de este modo, a la formación de 12 moléculas de 3-fosfoglicerato, que son convertidas en 12 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato con un gasto de 12 moléculas tanto de ATP como de NADPH. Dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato son empleadas a continuación para la síntesis de glucosa y diez moléculas continúan en el ciclo de Calvin para dar lugar a seis moléculas de ribulosa-5-fosfato. El ciclo se completa entonces con el uso adicional de seis moléculas de ATP para la síntesis de ribulosa-1,5-difosfato.

léculas de ATP y 12 de NADPH por cada molécula de glucosa sintetizada. Se necesitan dos electrones para convertir cada molécula de $NADP^+$ a NADPH, así que deben pasar 24 electrones por la cadena de transporte de electrones para generar suficiente NADPH para sintetizar una molécula de glucosa. Estos electrones se obtienen de la conversión de 12 moléculas de H_2O a seis moléculas de O_2, lo que produce la formación de seis moléculas de O_2 por cada molécula de glucosa. Pasados estos mismos 24 electrones por la cadena de transporte de electrones pueden también generar los 18 ATP que se requieren para el ciclo de Calvin. Sin embargo, en algunas condiciones, la producción de ATP a partir del transporte de electrones puede ser menos eficiente, y parte del ATP necesario para el ciclo del Calvin puede generarse mediante flujo cíclico de electrones, que utiliza la energía de la luz del sol para sintetizar ATP sin la síntesis de NADPH (véase Fig. 3-14).

ANIMACIÓN 3.4

sites.sinauer.com/cooper7e/a3.4

El ciclo de Calvin. En el ciclo de Calvin de la fotosíntesis, seis moléculas de dióxido de carbono son utilizadas para generar una molécula de glucosa.



Biosíntesis de los componentes celulares

Las secciones anteriores repasaban las principales reacciones metabólicas a través de las cuales la célula obtiene y almacena energía en forma de ATP. Esta energía metabólica se emplea entonces para realizar diversas tareas, incluyendo la síntesis de macromoléculas y otros constituyentes celulares. De este modo, la energía derivada de la degradación de moléculas orgánicas (catabolismo) se utiliza para promover la síntesis de otros componentes necesarios de la célula. La mayoría de las vías catabólicas implican la oxidación de moléculas orgánicas acoplada a la generación tanto de energía (ATP) como de poder reductor (NADH). En contraste, las vías biosintéticas (anabólicas) generalmente implican la utilización tanto de ATP como de poder reductor (habitualmente en forma de NADPH) para la producción de nuevos compuestos orgánicos. Una vía biosintética importante, la síntesis de carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O durante las reacciones oscuras de la fotosíntesis, ya se trató en la sección anterior. Otras vías que conducen a la biosíntesis de los principales constituyentes celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) se revisan en las siguientes secciones.

Carbohidratos

Además de obtenerse directamente de la alimentación o generada por la fotosíntesis, la glucosa puede sintetizarse a partir de otras moléculas orgánicas. En células animales, la síntesis de glucosa (**gluconeogénesis**) comienza habitualmente con lactato (producido en la glicólisis anaerobia), aminoácidos (derivados de la degradación de proteínas), o glicerol (producido en la degradación de lípidos). Las plantas (pero no los animales) también son capaces de sintetizar glucosa a partir de ácidos grasos —un proceso que es especialmente importante durante la germinación de las semillas, cuando la energía almacenada como grasas debe ser transformada en carbohidratos para sustentar el crecimiento de la planta—. Tanto en células animales como vegetales, los azúcares simples son polimerizados y almacenados como polisacáridos.

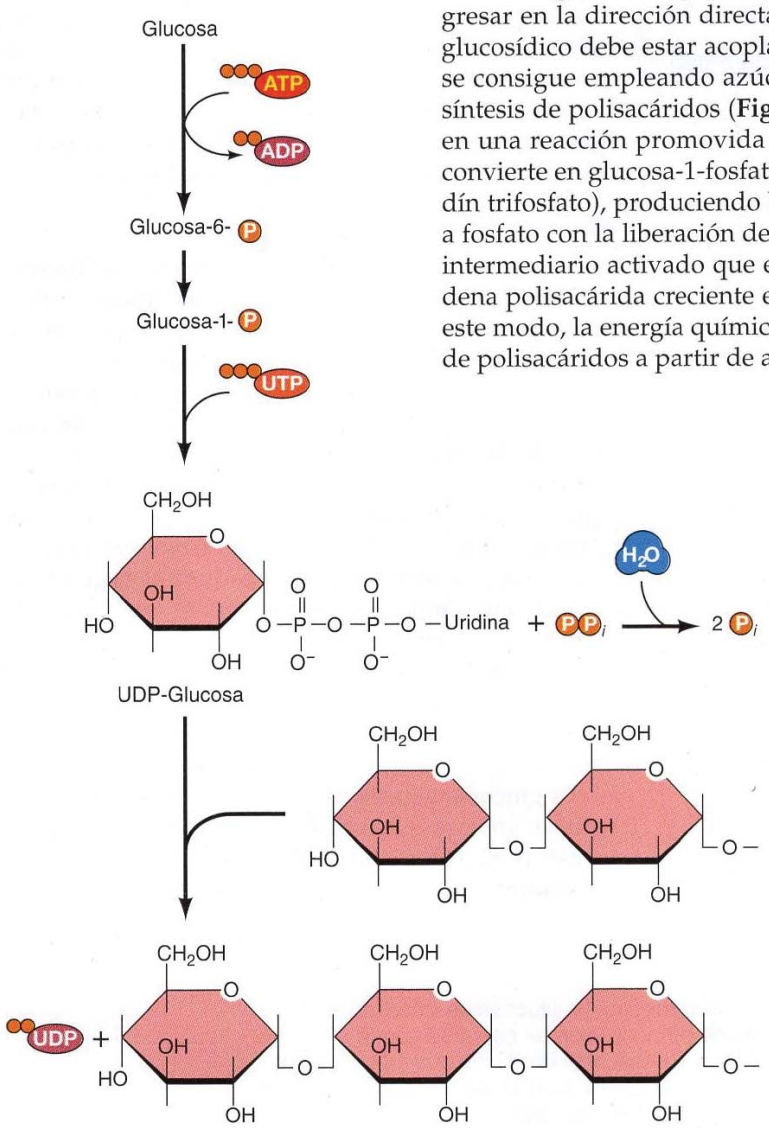
La gluconeogénesis implica la conversión de piruvato en glucosa —esencialmente es lo inverso a la glicólisis (**Fig. 3.16**)—. Sin embargo, como se ha tratado anteriormente, la conversión glucolítica de glucosa a

FIGURA 3.16 Glucogénesis. La glucosa es sintetizada a partir de dos moléculas de piruvato, con un coste de cuatro moléculas de ATP, dos moléculas de GTP y dos moléculas de NADH. Los pasos que requieren energía de la gluconeogénesis están indicados mediante flechas rojas.

piruvato es una vía productora de energía, generando dos moléculas de ATP y de NADH. Aunque algunas reacciones de la glicólisis son fácilmente reversibles, otras solamente se producirán en la dirección de la degradación de glucosa, porque están asociadas con un gran descenso en la energía libre. Estas reacciones energéticamente favorables de la glicólisis son puenteadas durante la gluconeogénesis por otras reacciones (catalizadas por enzimas diferentes) que están acopladas al consumo de ATP y NADH para poder conducirlas en la dirección de la síntesis de glucosa. En total, la generación de glucosa a partir de dos moléculas de piruvato requiere de cuatro moléculas de ATP, dos de GTP y dos de NADH. Este proceso es considerablemente más costoso que la simple inversión de la glicólisis (que requeriría dos moléculas de ATP y dos de NADH), demostrando la necesidad de energía adicional para conducir la vía en la dirección de la biosíntesis.

Tanto en las células animales como en las vegetales, la glucosa se almacena en forma de polisacáridos (glucógeno y almidón, respectivamente). La síntesis de polisacáridos, como la del resto de macromoléculas, es una reacción que requiere energía. Como se comentó en el Capítulo 2, la unión de dos azúcares por un enlace glucosídico puede describirse como una reacción de deshidratación, donde se retira H_2O (véase Fig. 2.3). Dicha reacción, sin embargo, es energéticamente desfavorable y, por tanto, incapaz de progresar en la dirección directa. En consecuencia, la formación de un enlace glucosídico debe estar acoplada a una reacción productora de energía, que se consigue empleando azúcares nucleotídicos como intermediarios en la síntesis de polisacáridos (**Fig. 3.17**). En primer lugar, la glucosa se fosforila en una reacción promovida por ATP a glucosa-6-fosfato, que entonces se convierte en glucosa-1-fosfato. La glucosa-1-fosfato reacciona con UTP (uridín trifosfato), produciendo UDP-glucosa más pirofosfato, que se hidroliza a fosfato con la liberación de energía libre adicional. La UDP-glucosa es un intermediario activado que entonces dona su residuo de glucosa a una cadena polisacárida creciente en una reacción energéticamente favorable. De este modo, la energía química en forma de ATP y UTP promueve la síntesis de polisacáridos a partir de azúcares simples.

FIGURA 3.17 Síntesis de polisacáridos. La glucosa se convierte primero en una forma activada, UDP-glucosa, a costa de una molécula de ATP y otra de UTP. El residuo de glucosa entonces puede transferirse de la UDP-glucosa a una cadena polisacárida creciente en una reacción energéticamente favorable.



Lípidos

Los lípidos son importantes moléculas de depósito de energía y los componentes principales de las membranas celulares. Se sintetizan a partir de acetil-CoA, que se forma en la degradación de los carbohidratos, en una serie de reacciones que se parecen a la inversa de la oxidación de ácidos grasos. Como en la biosíntesis de carbohidratos, sin embargo, las reacciones que conducen a la síntesis de ácidos grasos difieren de las implicadas en su degradación. Son impulsadas en la dirección de la biosíntesis acoplándose al consumo tanto de energía en forma de ATP como de poder reductor en forma de NADPH. Los ácidos grasos se sintetizan al añadir paso a paso unidades de dos carbonos derivados de acetil-CoA a una cadena creciente. La adición de cada una de estas unidades de dos carbonos requiere del gasto de una molécula de ATP y dos moléculas de NADPH.

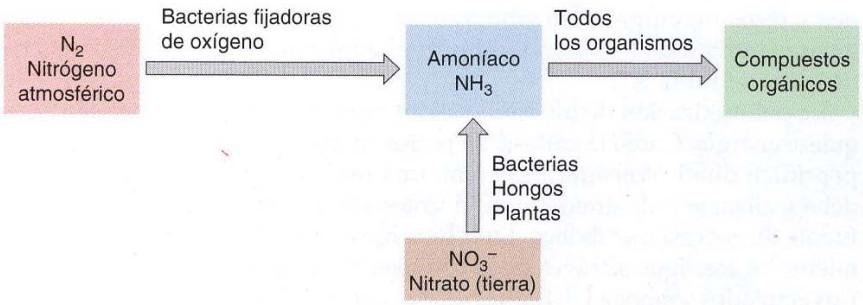


FIGURA 3.18 Asimilación de nitrógeno a los compuestos orgánicos. El amoníaco se incorpora a los compuestos orgánicos en todos los organismos. Algunas bacterias son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico en amoníaco, y la mayoría de las bacterias, hongos y plantas pueden utilizar el nitrato de la tierra.

El principal producto de la biosíntesis de ácidos grasos, que sucede en el citoplasma de las células eucariotas, es el palmitato, ácido graso de 16 carbonos. Entonces, los principales componentes de las membranas celulares (fosfolípidos, esfingomielina y glucolípidos) se sintetizan a partir de ácidos grasos libres en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi (véase Cap. 11).

Proteínas

A diferencia de los carbohidratos y los lípidos, las proteínas (así como los ácidos nucleicos) contienen nitrógeno además de carbono, hidrógeno y oxígeno. El nitrógeno se incorpora a los compuestos orgánicos a partir de distintas fuentes en diferentes organismos (**Fig. 3.18**). Algunas bacterias pueden usar N_2 atmosférico por un proceso denominado **fijación de nitrógeno**, en el que N_2 se reduce a NH_3 a expensas de energía en forma de ATP. Aunque relativamente pocas especies de bacterias son capaces de fijar nitrógeno, la mayoría de las bacterias, hongos y plantas pueden usar nitrato (NO_3^-), que es un componente frecuente de la tierra, reduciéndolo a NH_3 gracias a los electrones derivados del NADH o NADPH. Finalmente, todos los organismos son capaces de incorporar amoníaco (NH_3) a componentes orgánicos.

El NH_3 se incorpora a las moléculas orgánicas principalmente durante la síntesis de los aminoácidos glutamato (Glu) y glutamina (Gln), que se obtienen a partir del intermediario del ciclo del ácido cítrico, α-cetoglutarato. Estos aminoácidos funcionan después como donantes de grupos amino durante la síntesis de los otros aminoácidos, que también se producen a partir de otras vías metabólicas centrales, como la glicólisis o el ciclo del ácido cítrico (**Fig. 3.19**). Así, el material básico para la síntesis de aminoácidos se obtiene de la glucosa, y los aminoácidos se sintetizan a costa de energía (ATP) y de poder reductor (NADPH). Muchas bacterias y plantas pueden sintetizar todos los 20 aminoácidos. Los huma-

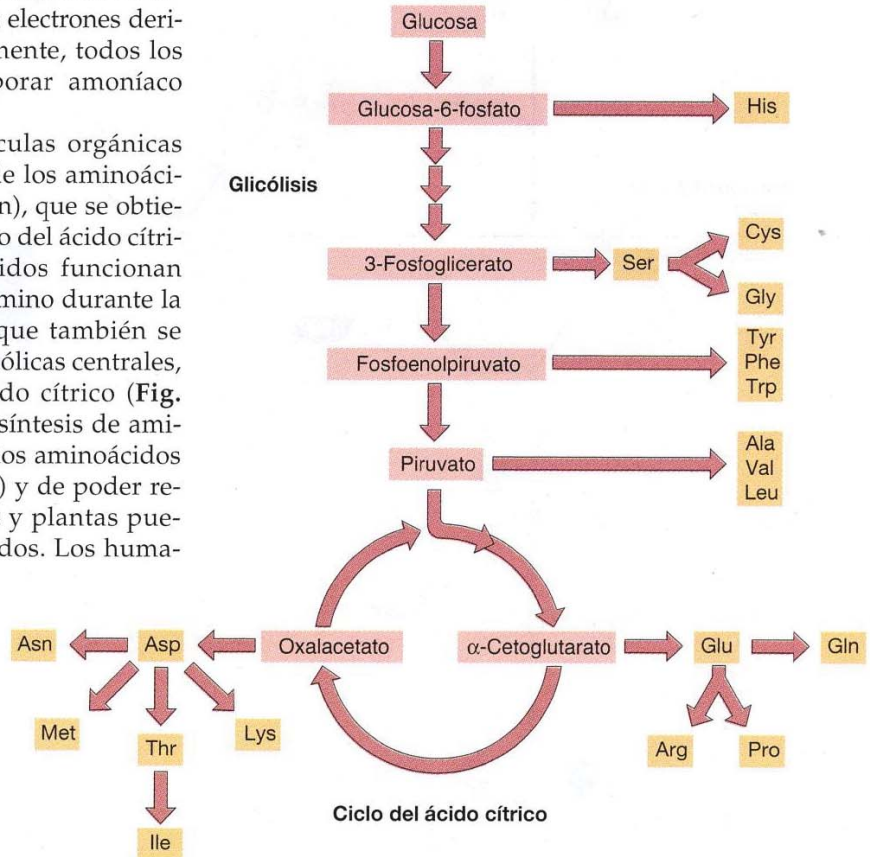


FIGURA 3.19 Biosíntesis de los aminoácidos. Los esqueletos carbonados de los aminoácidos se obtienen a partir de intermediarios de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico.

nos y otros mamíferos, sin embargo, sólo pueden sintetizar aproximadamente la mitad de los aminoácidos que requieren; el resto debe obtenerse de la dieta (**Tabla 3.1**).

La polimerización de los aminoácidos para formar proteínas también requiere energía. Como la síntesis de polisacáridos, la formación de un enlace peptídico puede considerarse como una reacción de deshidratación, que debe realizarse en la dirección de la síntesis de proteínas acoplándose a otra fuente de energía metabólica. En la biosíntesis de polisacáridos, este acoplamiento se consigue a través de la conversión de los azúcares a intermediarios activados, como la UDP-glucosa. Los aminoácidos son activados de forma similar antes de utilizarse para la síntesis de proteínas.

Una importante diferencia entre la síntesis de proteínas y la de polisacáridos es que los aminoácidos se incorporan a las proteínas en un orden particular, especificado por un gen. El orden de los nucleótidos en un gen especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína a través de la traducción, en la que el ARN mensajero (ARNm) actúa como molde para la síntesis proteínica (véase Cap. 4). Cada aminoácido se une primero a una molécula de ARN de transferencia (ARNt) específica en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP (**Fig. 3.20**). Entonces los aminoacil ARNt se alinean en el molde de ARNm unido a los ribosomas, y cada aminoácido se añade al extremo C terminal de una cadena peptídica creciente por medio de una serie de reacciones que serán tratadas en detalle en el Capítulo 9. Durante el proceso, se hidrolizan sólo dos moléculas de GTP, así que la incorporación de cada aminoácido a una proteína está acoplada a la hidrólisis de una molécula de ATP y dos de GTP.

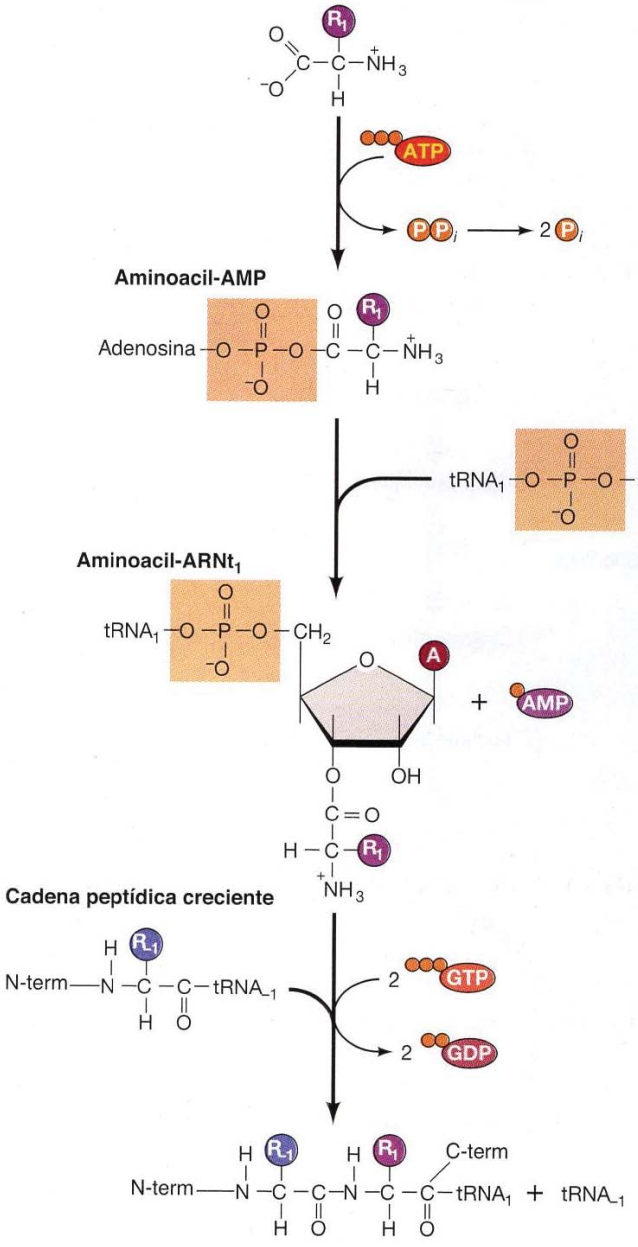


FIGURA 3.20 Formación de un enlace peptídico. Un aminoácido es activado primero a través de la unión a su ARNt en una reacción de dos pasos que implica la hidrólisis de ATP a AMP. Los ARNt sirven como adaptadores para alinear los aminoácidos en un molde de ARNm unido a ribosomas. Cada aminoácido es transferido entonces al extremo C terminal de una cadena peptídica creciente a costa de dos moléculas de GTP.

TABLA 3.1 Requerimientos dietéticos de aminoácidos en el hombre

Esencial	No esencial
Histidina	Alanina
Isoleucina	Arginina[a]
Leucina	Asparagina
Lisina	Aspartato
Metionina	Cisteína
Fenilalanina	Glutamato
Treonina	Glutamina
Triptófano	Glicina
Valina	Prolina
	Serina
	Tirosina

Los aminoácidos esenciales deben obtenerse de la dieta; los aminoácidos no esenciales pueden ser sintetizados por células humanas.

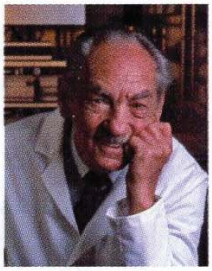
[a]Aunque la arginina se clasifica como un aminoácido no esencial, los niños en crecimiento deben tener un aporte de arginina adicional en su dieta.

EXPERIMENTO CLAVE

Antimetabolitos y quimioterapia

Antagonistas de derivados de ácidos nucleicos VI. Purinas
Gertrude B. Elion, George H. Hitchings y Henry Vanderwerff
Wellcome Research Laboratories, Tuckahoe, NY
Journal of Biological Chemistry, Volumen 192, 1951, págs. 505-518

Gertrude B. Elion


George H. Hitchings

Contexto

Gertrude Elion y George Hitchings empezaron una colaboración en 1944 que duró más de 20 años y dio lugar al desarrollo de medicinas que han sido eficientes para el tratamiento de cáncer, gota, virus e infecciones parasitarias. El principio de su enfoque para el desarrollo de medicinas se basaba en la teoría del antimetabolito, que inicialmente proponía que algunas moléculas activas frente a bacterias funcionaban previniendo la utilización de los nutrientes esenciales (metabolitos) por parte de las células bacterianas. Elion y Hitchings sugirieron que el crecimiento de células que se dividen rápidamente, como las células cancerosas, podría inhibirse mediante análogos de las bases de los ácidos nucleicos que interfiriesen con la síntesis normal del ADN. Procedieron a ensayar esta hipótesis sintetizando un gran número de compuestos relacionados con las purinas y ensayando sus efectos biológicos. Estos estudios dieron lugar al descubrimiento de que la 6-mercaptopurina era un potente inhibidor de la utilización de purina en bacterias, a lo que rápidamente le siguieron estudios mostrando que era un medicamento eficaz para el tratamiento de leucemia aguda en niños.

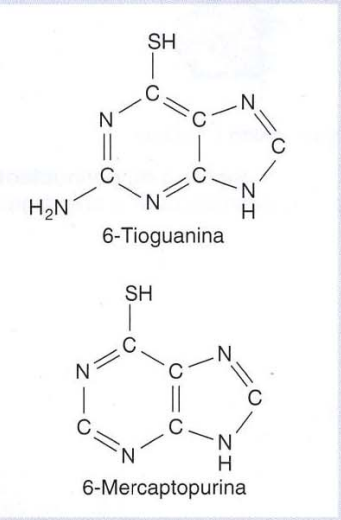
Experimentos

Elion y Hitchings eligieron ensayar las actividades potenciales de análogos de purina sobre el crecimiento de la bacteria *Lactobacilus casei*. En 1948, encontraron que el compuesto 2,6-diaminopurina inhibía el crecimiento de *L. casei* interfiriendo con el metabolismo normal de las purinas. Extendieron sus ensayos en su trabajo de 1951 ensayando los efectos de 100 purinas diferentes, con sustituciones de grupos amino, hidroxilo, metilo, cloro, sulfhidrilo y otros grupos químicos en diferentes posiciones del anillo de purina. Dos compuestos, la 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina, en los que el oxígeno estaba sustituido por sulfuro en la posición 6 de la guanina y la hipoxantina, resultaron ser fuertes inhibidores del crecimiento bacteriano (véase figura). Estos compuestos resultaron ser inhibidores activos de una variedad de cánceres en roedores, dando lugar al primer ensayo de la 6-mercaptopurina como tratamiento de leucemia infantil. Los resultados de este ensayo tuvieron un éxito espectacular, y la 6-mercaptopurina fue aprobada para el tratamiento de leucemia infantil por la Food and Drug Administration en 1953, tan sólo dos años después de su síntesis y de la demostración inicial de su actividad como un antimetabolito de purina en bacterias.

Impacto

El éxito de la 6-mercaptopurina en el tratamiento de la leucemia infantil proporcionó pruebas convincentes de que los inhibidores del metabolismo de ácidos nucleicos podían ser medicamentos efectivos frente al cáncer. Este sigue siendo el caso hoy en día, y la 6-mercaptopurina sigue siendo uno de los medicamentos empleados con éxito para el tratamiento de la leucemia. Adicionalmente, un número de otros antimetabolitos que interfieren con el metabolismo de los ácidos nucleicos, han resultado ser útiles en la terapia contra el cáncer.

Gertrude Elion y George Hitchings continuaron su trabajo en colaboración sobre los antimetabolitos de purina hasta la jubilación de Hitchings en 1967. Además de la 6-mercaptopurina, desarrollaron medicamentos que se utilizan para la inmunosupresión después del trasplante de tejidos, para el tratamiento de artritis reumatoide, el tratamiento de gota, y para el tratamiento de infecciones parasitarias. Después de la jubilación de Hitchings, Elion centró su investigación en el tratamiento de infecciones virales y desarrolló el primer medicamento eficaz contra las infecciones víricas humanas —el análogo de la guanina aciclovir, que es muy activo frente al herpes simplex y otros herpesvirus—. Éxitos consiguientes al desarrollo de antimetabolitos de ácidos nucleicos como medicamentos antivirales incluyen el análogo de la timina AZT, que es ampliamente utilizado como inhibidor de VIH en el tratamiento de SIDA. El trabajo pionero de Elion y Hitchings ha abierto diversas nuevas áreas de investigación y ha tenido un profundo impacto sobre el tratamiento de una amplia gama de enfermedades.



Estructuras de la 6-tioguanina y la 6-mercaptopurina

Ácidos nucleicos

Los precursores de los ácidos nucleicos, los nucleótidos, están compuestos de azúcares de cinco carbonos fosforilados unidos a bases nucleicas. Los nucleótidos pueden ser sintetizados a partir de carbohidratos y aminoácidos; también pueden ser obtenidos de la dieta o reutilizados tras la degradación de ácidos nucleicos. El punto de partida para la biosíntesis de nucleótidos es el azúcar fosforilado ribosa-5-fosfato, que se obtiene a partir de glucosa-6-fosfato. Vías divergentes conducen entonces a la síntesis de ribonucleótidos de purina y pirimidina, que son los precursores inmediatos de la síntesis de ARN (**Fig. 3.21**). Estos ribonucleótidos se convierten en desoxirribonucleótidos, que sirven como ladrillos de construcción monoméricos del ADN.

El ARN y ADN son polímeros de nucleósidos monofosfato. Como para otras macromoléculas, sin embargo, la polimerización directa de nucleósidos monofosfato es energéticamente desfavorable, y la síntesis de polinucleótidos utiliza en su lugar nucleósidos trifosfatos como precursores activados (**Fig. 3.22**). Un nucleósido 5′-trifosfato se añade a un grupo 3′ hidroxilo de una cadena polinucleotídica creciente, con la liberación y posterior hidrólisis de pirofosfato como promotor de la reacción en la dirección de la síntesis de polinucleótidos.

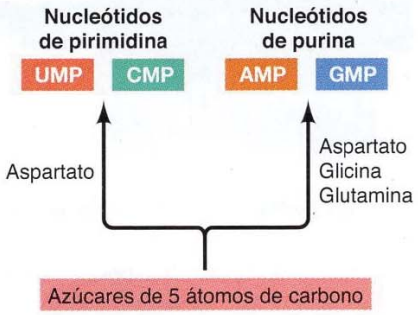


FIGURA 3.21 Biosíntesis de nucleótidos de pirimidina y purina. Los nucleótidos de pirimidina y purina se sintetizan a partir de ribosa-5-fosfato (azúcares de 5 átomos de carbono) y varios aminoácidos.

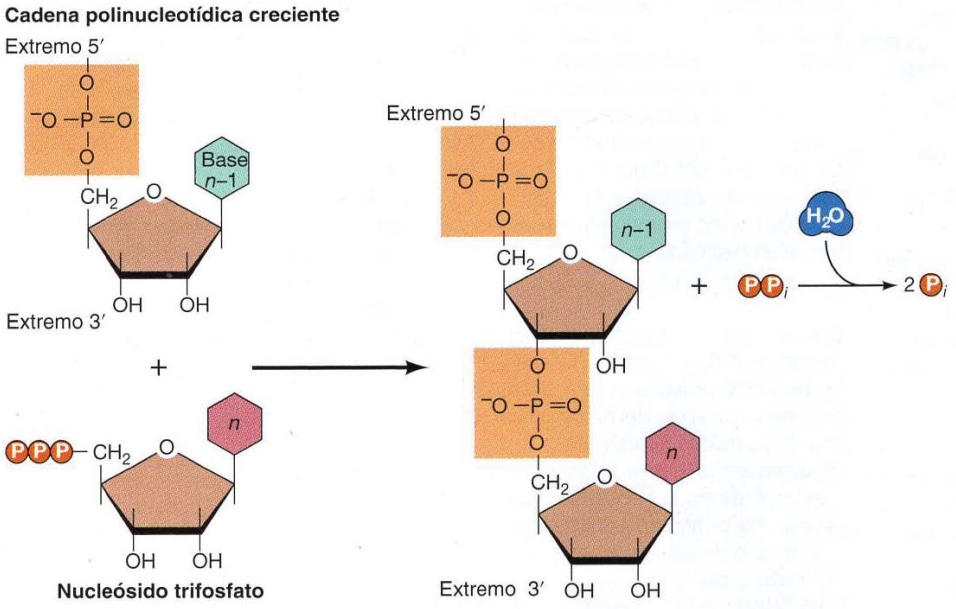


FIGURA 3.22 Síntesis de polinucleótidos. Nucleósidos trifosfato se unen al extremo 3′ de una cadena polinucleotídica creciente con la liberación de pirofosfato.

RESUMEN

Energía metabólica y ATP

Energía libre y ATP: El ATP funciona como un depósito de energía libre, que es empleado para promover reacciones que requieren energía dentro de las células.

energía libre de Gibbs (G), adenosina 5′-trifosfato (ATP), enlace de alta energía

Glicólisis y ciclo de Krebs: La degradación de glucosa es una fuente importante de energía celular. La glicólisis es la fase inicial de la descomposición de la glucosa en todas las células. En células aeróbicas, la oxidación de la glucosa se completa mediante el ciclo de Krebs, que produce 36 y 38 moléculas de ATP. La mayoría de este ATP se deriva de las reacciones de transporte de electrones en las que el O_2 es reducido a H_2O.

glicólisis, coenzima A (CoA-SH), ciclo del ácido cítrico, ciclo de Krebs, flavín adenín dinucleótido ($FADH_2$)

Ver Animaciones 3.1 y 3.2

Obtención de energía de lípidos: El ATP también puede ser obtenido a partir de la degradación de otras moléculas orgánicas aparte de la glucosa. Debido a que las grasas están más reducidas que los carbohidratos, proporcionan una fuente más eficaz de almacenamiento de energía.

Transporte de electrones y fosforilación oxidativa

Cadena de transporte de electrones: La mayor parte de la energía derivada del metabolismo oxidativo procede de la transferencia de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ al O_2. Para poder disponer de esta energía, los electrones son transferidos a través de una serie de transportadores organizados en cuatro complejos proteicos en la membrana mitocondrial interna.

cadena de transporte de electrones, coenzima Q, ubiquinona, citocromo *c*, citocromo oxidasa, fosforilación oxidativa

Acoplamiento quimiosmótico: Las reacciones productoras de energía del transporte de electrones están acopladas a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía potencial almacenada en este gradiente se obtiene mediante un quinto complejo proteínico, la ATP sintetasa, que acopla la síntesis de ATP al retorno, energéticamente favorable, de los protones a la matriz mitocondrial.

acoplamiento quimiosmótico, gradiente electroquímico, ATP sintetasa

Ver Vídeo 3.1

Fotosíntesis

Transporte de electrones: La energía requerida para la síntesis de moléculas orgánicas se obtiene en último término de la luz solar, que es aprovechada por las plantas y las bacterias fotosintéticas. En la primera etapa de la fotosíntesis, la energía de la luz solar se emplea para promover la síntesis de ATP y NADPH, acoplada a la oxidación de H_2O a O_2. El ATP y el NADPH producidos en estas reacciones son empleados entonces para sintetizar glucosa a partir de CO_2 y H_2O. La energía de la luz solar es absorbida por las clorofilas, que excitan electrones a un estado energético superior. Estos electrones de alta energía son transferidos después a través de una serie de transportadores de membrana, junto con la síntesis de ATP y la reducción de $NADP^+$ a NADPH.

reacciones luminosas, reacciones oscuras, clorofila, fotocentro, fotosistema I, fotosistema II, complejo citocromo *bf*, NADP reductasa, flujo cíclico de electrones

Ver Animación 3.3

Síntesis de ATP: La síntesis quimiosmótica de ATP está dirigida por un gradiente de protones.

Síntesis de glucosa: El ATP y el NADPH se utilizan después en la síntesis de glucosa a partir de CO_2, que tiene lugar en los cloroplastos.

Ciclo de Calvin

Ver Animación 3.4

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Biosíntesis de los componentes celulares

Carbohidratos: La glucosa puede ser sintetizada a partir de otras moléculas orgánicas, empleando energía y poder reductor en forma de ATP y NADH, respectivamente. Entonces se necesita ATP adicional para promover la síntesis de polisacáridos a partir de azúcares simples.

Lípidos: Los lípidos son sintetizados a partir de acetil CoA, que se forma en la degradación de los carbohidratos.

Proteínas: Los aminoácidos son sintetizados a partir de intermediarios de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico. Su polimerización para formar proteínas requiere energía adicional en forma de ATP y GTP.

Ácidos nucleicos: Los nucleótidos de pirimidina y purina son sintetizados a partir de carbohidratos y aminoácidos. Su polimerización a ADN y ARN es promovida por la utilización de nucleósidos trifosfatos como precursores activados.

PALABRAS CLAVE

gluconeogénesis

fijación de nitrógeno

Preguntas

1. Muchas reacciones bioquímicas son energéticamente desfavorables bajo condiciones fisiológicas ($\Delta G^{\circ\prime} > 0$). ¿Cómo lleva a cabo la célula estas reacciones?
2. Considera la siguiente reacción:
   Fructosa-6-fosfato + $HPO_4^{2-} \rightleftharpoons$ Fructosa-1,6-difosfato + H_2O, $\Delta G^{\circ\prime}$ = +4 kcal/mol.
   Conociendo la variación de energía libre estándar para la hidrólisis de ATP (–7,3 kcal/mol), calcula la variación de energía libre estándar para la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa.
3. Considera la reacción A $\rightleftharpoons$ B + C, en la que $\Delta G^{\circ\prime}$ = –3,5 kcal/mol. Calcula ΔG en condiciones intracelulares, sabiendo que la concentración de A es 10^{-2} *M* y las concentraciones de B y C son ambas de 10^{-3} *M*. ¿En qué dirección progresará la reacción en la célula? Para tus cálculos, $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/grado y T = 298 K (25 °C). Recuerda que $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$.
4. ¿Cómo se vería afectada la glicólisis por un incremento en la concentración de ATP celular?
5. Las levaduras pueden crecer bajo condiciones anaeróbicas además de bajo condiciones aeróbicas. Por cada molécula de glucosa consumida, ¿cuántas moléculas de ATP serán generadas por levaduras crecidas en condiciones anaeróbicas en comparación con las condiciones aeróbicas?
6. ¿Cómo regeneran los organismos anaeróbicos NAD^+ a partir del NADH que se producen durante la glicólisis?
7. ¿Por qué los lípidos son más eficientes como moléculas de almacenamiento de energía que los carbohidratos?
8. Supón que el potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial interna se disipa, de manera que el gradiente electroquímico está formado exclusivamente por un gradiente de concentración de protones que corresponde a un pH unitario. Calcula la energía libre almacenada en este gradiente. Para el cálculo, utiliza $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/grado, T = 298 °K (25 °C), y observa que $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$.
9. ¿Cuáles son las funciones de la coenzima Q y el citocromo *c* en la cadena de transporte de electrones?

10. ¿Cuántos electrones de alta energía se necesitan para activar la síntesis de una molécula de glucosa durante la fotosíntesis, unido a la formación de seis moléculas de O_2? ¿Cuántas moléculas de ATP y NADPH son generadas por el paso de estos electrones a través de los fotosistemas I y II?
11. Diferencia entre las reacciones de la fase lumínica y la fase oscura de la fotosíntesis.
12. ¿Por qué la gluconeogénesis no es una simple reversión de la glicólisis?

Bibliografía

Energía metabólica y ATP

Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic cycle. Perspect. Biol. Med. 14: 154–170. [R]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2013. Bioenergetics. 4th ed. London: Academic Press.

Transporte de electrones y fosforilación oxidativa

Baradaran, R., J. M. Berrisford, G. S. Minhas and L. A. Sazanov. 2013. Crystal structure of the entire respiratory complex I. Nature 494: 443–448. [P]

Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. Science 206: 1148–1159. [R]

Mitchell, P. 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. Biochim. Biophys. Acta 1807: 1507–1538. [P]

Racker, E. 1980. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. Fed. Proc. 39: 210–215. [R]

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. Science 283: 1488–1493. [R]

Sazanov, L. A. 2015. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 16: 375–388. [R]

Watanabe, R. and H. Noji. 2013. Chemomechanical coupling mechanism of F1-ATPase: catalysis and torque generation. FEBS Letters 587: 1030-1035. [R]

Fotosíntesis

Arnon, D. I. 1984. The discovery of photosynthetic phosphorylation. Trends Biochem. Sci. 9: 258–262. [R]

Baniulis, D., E. Yamashita, H. Zhang, S.S. Hasan and W. A. Cramer. 2008. Structure-function of the cytochrome b6 f complex. Phytochem. Phytobiol. 84: 1349-1358. [R]

Calvin, M. 1962. The path of carbon in photosynthesis. Science 135: 879–889. [R]

Kargul, J., J. D. J. Olmos and T. Krupnik. 2012. Structure and function of photosystem I and its application in biomimetic solar-to-fuel systems. J. Plant Physiol. 169: 1639-1653. [R]

Schöttler, M. A., C. A. Albus and R. Bock. 2011. Photosystem I: its biogenesis and function in higher plants. J. Plant Physiol. 168: 1452–1461. [R]

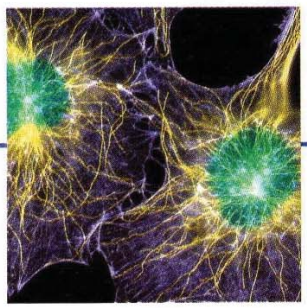
Vinyard, D. J., G. M. Ananyev and G. C. Dismukes. 2013. Photosystem II: the reaction center of oxygenic photosynthesis. Ann. Rev. Biochem. 82: 577-606. [R]

Biosíntesis de los componentes celulares

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2010. Biochemistry. 7th ed. New York: W. H. Freeman.

Canfield, D. E., A. N. Glazer and P. G. Falkowski. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. Science 330: 192–196. [R]

Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2013. Lehninger Principles of Biochemistry. 6th ed. New York: W. H. Freeman.



Capítulo 4

Fundamentos de biología molecular

Herencia, genes y ADN 111

Expresión de la información genética 118

ADN recombinante 124

Detección de ácidos nucleicos y proteínas 135

Función de los genes en eucariotas 141

EXPERIMENTO CLAVE:
Hipótesis del provirus de ADN 125

EXPERIMENTO CLAVE:
Interferencia de ARN 150

La biología molecular contemporánea se ocupa principalmente de la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética que en último término determinan la estructura y función celulares. Como fue expuesto en el Capítulo 1, todas las células comparten un número de propiedades básicas, y esta unidad subyacente de la biología celular es particularmente evidente en el nivel molecular. Tal unidad ha permitido a los científicos elegir organismos sencillos (como las bacterias) como modelos para muchos experimentos fundamentales asumiendo que mecanismos moleculares similares son comunes en organismos tan distintos como *E. coli* y el organismo humano. Numerosos experimentos han demostrado la validez de esta premisa, y actualmente es evidente que la biología molecular celular proporciona un marco unificador para comprender diversos aspectos del comportamiento celular.

Los avances iniciales en biología molecular se lograron aprovechando el rápido crecimiento y la facilidad de manipulación del genoma de bacterias sencillas como *E. coli*, y sus virus. A continuación, el desarrollo del ADN recombinante permitió establecer tanto los principios fundamentales, como diversos procedimientos experimentales desarrollados en un principio en procariotas y aplicados posteriormente a células eucariotas. La aplicación de la tecnología del ADN recombinante ha tenido un enorme impacto, inicialmente permitiendo el aislamiento y caracterización de genes eucarióticos individuales, y más recientemente permitiendo la determinación de secuencias completas de genomas celulares. En este capítulo se aborda el desarrollo temprano de la biología molecular, el ADN recombinante y los enfoques experimentales utilizados para investigar la función de los genes eucariotas.

Herencia, genes y ADN

Quizá la propiedad fundamental de todos los seres vivos es la capacidad de reproducirse. Todos los organismos heredan de sus progenitores la información genética especificando su estructura y función. De igual forma, todas las células provienen de otras células preexistentes, por lo que el material genético ha de ser replicado y transferido del progenitor a la célula hija en cada división celular. El modo por el cual la información genética es replicada y transmitida de célula a célula y de organismo a organismo representa pues una de las cuestiones centrales de la Biología. Así, la elucidación de los mecanismos de la transmisión genética y la identificación del ADN como el material genético fueron descubrimientos que constituyen los cimientos de nuestro entendimiento actual de la biología a nivel molecular.

Genes y cromosomas

Los principios genéticos clásicos fueron deducidos por Gregor Mendel en 1865, basándose en experimentos con guisantes. Mendel estudió la herencia

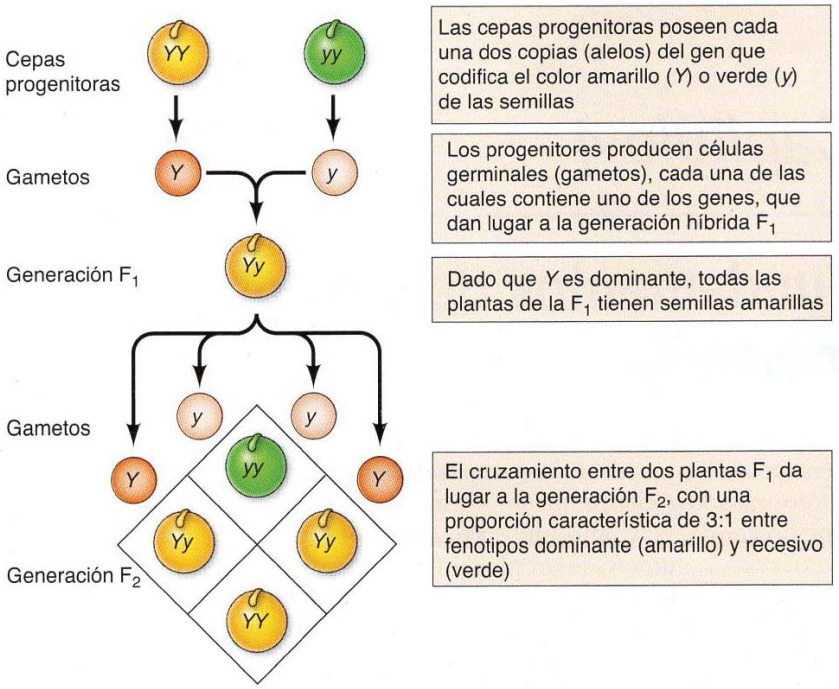


FIGURA 4.1 Herencia de genes dominantes y recesivos.

de un número de rasgos bien definidos, como el color de la semilla, y fue capaz de deducir las reglas generales para su transmisión. Interpretó correctamente los patrones de herencia observados asumiendo que cada rasgo está determinado por un par de factores heredados, conocidos actualmente como **genes**. De cada progenitor se hereda una copia del gen (llamada **alelo**) especificando cada rasgo. Por ejemplo, cruzando dos variedades de guisantes —una con semillas amarillas y otra con semillas verdes— se obtienen los siguientes resultados (**Fig. 4.1**). Las cepas progenitoras tienen cada una dos copias idénticas del gen que especifica el color amarillo (*Y*) o verde (*y*) de las semillas, respectivamente. Las plantas hijas son por tanto híbridos, habiendo heredado un gen para semillas amarillas (*Y*) y otro para semillas verdes (*y*). Todas estas plantas hijas (la primera generación o F_1) tiene semillas amarillas, por lo que se dice que el amarillo (*Y*) es **dominante** y el verde (*y*) **recesivo**. El **genotipo** (composición genética) de los guisantes F_1 es entonces *Yy*, y su **fenotipo** (apariencia física) es amarillo. Si se cruza un descendiente F_1 con otro, dando lugar a la generación F_2, los genes de las semillas amarillas y verdes se segregan de tal forma que la proporción entre plantas F_2 con semillas amarillas y aquellas con semillas verdes es 3:1.

Los descubrimientos de Mendel, aparentemente por delante de su tiempo, fueron ignorados hasta 1900, cuando las leyes de Mendel fueron redescubiertas y se reconoció su importancia. Poco después se propuso el papel de los **cromosomas** como portadores de genes, al evidenciar que la mayor parte de las células de plantas superiores y animales son **diploides**, es decir, contienen dos copias de cada cromosoma. Sin embargo, la formación de las células germinales (el espermatozoide y el óvulo) se produce a través de un tipo característico de división celular (**meiosis**) en el cual un único cromosoma de cada par se transmite a cada célula hija (**Fig. 4.2**). Por lo tanto, el espermatozoide y el óvulo son **haploides**, dado que contiene una copia de cada cromosoma. La unión de estas dos células haploides (gametos) en la fertilización da lugar a un nuevo organismo diploide, que contiene ahora un cromosoma de cada par procedente de cada progenitor, masculino y femenino. El comportamiento de

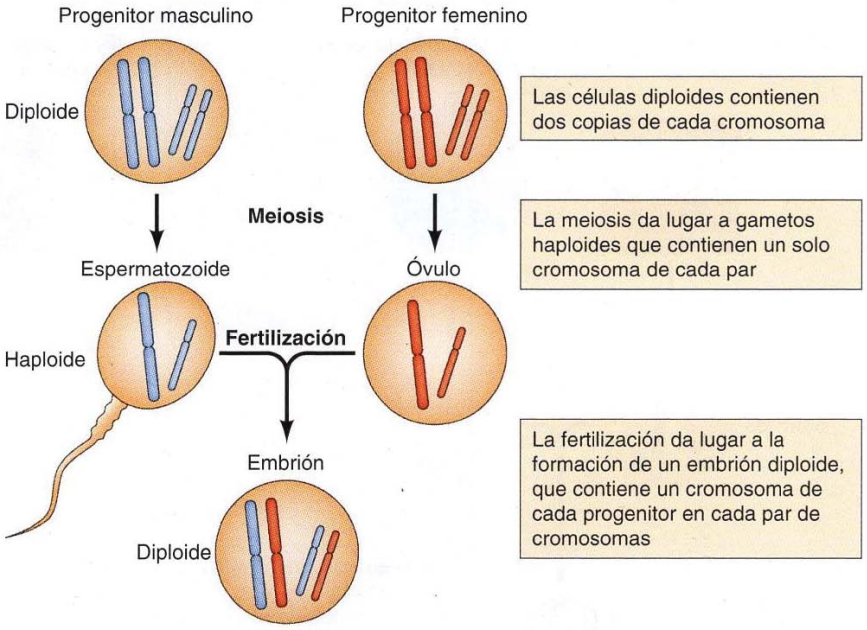


FIGURA 4.2 Cromosomas durante la meiosis y fertilización. Se ilustran dos pares de cromosomas de un organismo hipotético.

los pares de cromosomas se asemeja al de los genes, llevando a la conclusión de que los genes son transportados por los cromosomas.

Los fundamentos de las mutaciones, ligamiento genético y las relaciones entre genes y cromosomas fueron en su mayor parte establecidos en experimentos con la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster. Drosophila* se mantiene con facilidad en el laboratorio, y se reproduce cada dos semanas, lo cual es una considerable ventaja para experimentos genéticos. De hecho, estas características siguen haciendo a *Drosophila* un organismo de elección para estudios genéticos en animales, particularmente en el análisis genético del desarrollo y la diferenciación.

A principios del siglo pasado se identificaron una serie de alteraciones genéticas (**mutaciones**) en *Drosophila*, afectando a características fácilmente observables como el color de los ojos o la forma de las alas. Los experimentos de cruzamiento indicaron que algunos de los genes responsables de estos rasgos se heredan de forma independiente entre ellos, sugiriendo que estos genes se localizan en diferentes cromosomas que se segregan independientemente durante la meiosis (**Fig. 4.3**). Otros genes, por otro lado, se heredan juntos como características emparejadas. Dichos genes se dice que están ligados entre sí en virtud de estar localizados en el mismo cromosoma. El número de grupos de genes ligados es el mismo que el número de cromosomas (cuatro en *Drosophila*), apoyando la idea de que los cromosomas son los portadores de los genes. En 1915, se habían definido y mapeado casi 100 genes en cuatro cromosomas de *Drosophila*, dando lugar a una aceptación general de la base cromosómica de la herencia.

Genes y enzimas

Los estudios genéticos iniciales se centraron en la identificación y localización cromosómica de los genes que controlan características fácilmente observables, como el color de los ojos de *Drosophila*. Sin embargo, el modo por el que los genes producían los fenotipos observados era desconocido. La primera observación de la relación entre genes y enzimas llegó en 1909, cuando se evidenció que la enfermedad hereditaria humana fenilcetonuria resultaba de un defecto genético en el metabolismo del aminoácido fenilalanina. Surgió la hipótesis de que el defecto aparecía por una deficiencia de la enzima necesaria

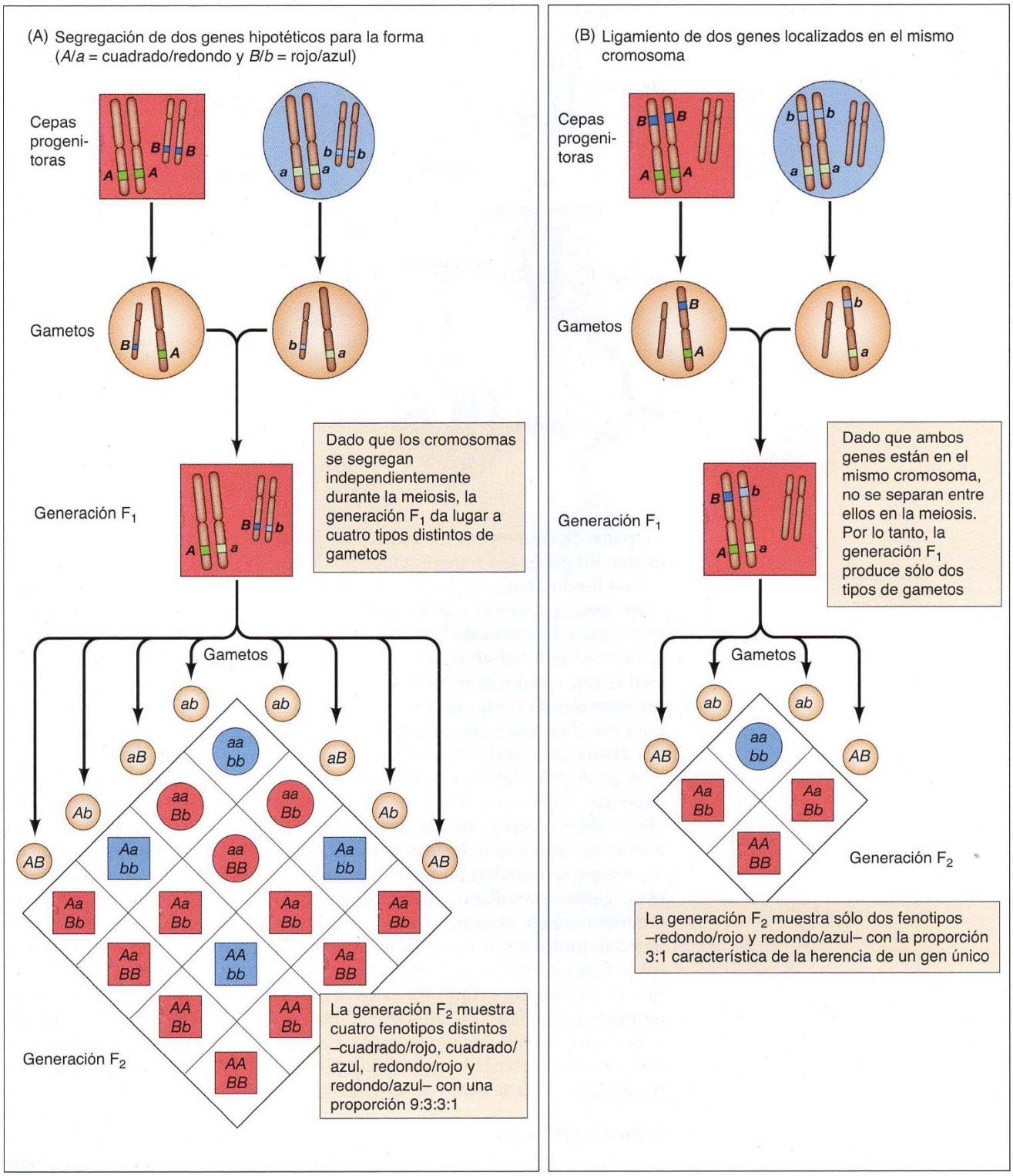


FIGURA 4.3 Segregación y ligamento genético.

para catalizar alguna reacción metabólica implicada en el metabolismo aminoácido, llevando a la presunción general de que los genes especifican la síntesis de enzimas.

Una evidencia más clara de la relación entre los genes y la síntesis de enzimas llegó con los experimentos de George Beadle y Edward Tatum, llevados a cabo en 1941 con el hongo *Neurospora crassa*. En el laboratorio, *Neurospora* puede cultivarse en medios de cultivo básicos o enriquecidos similares a los descritos en el Capítulo 1 para el cultivo de *E. coli*. Para *Neurospora* los medios básicos contienen únicamenste sal, glucosa y biotina (una vitamina del complejo B); los enriquecidos se suplementan con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Beadle y Tatum aislaron cepas mutantes de *Neurospora* que crecían con normalidad en medios enriquecidos pero no crecían en medios básicos. Se encontró que cada mutante requería un suplemento nutricional específico, como un determinado aminoácido, para poder crecer. Además se correlacionaba la necesidad de un determinado nutriente con la incapacidad de la cepa mutante para sintetizarlo. De este modo, cada mutación producía una deficiencia en una vía metabólica específica. Como se sabía que esas vías metabólicas estaban gobernadas por enzimas, la conclusión crucial de estos experimentos fue que los genes determinaban la estructura de las enzimas. Además, actualmente sabemos que algunos genes codifican ARN funcionales, como ARN de transferencia o ribosómico, en vez de proteínas.

Identificación del ADN como material genético

El entendimiento de la base cromosómica de la herencia y la relación entre genes y enzimas no aportaron *per se* una explicación molecular del gen. Los cromosomas contienen proteínas además de ADN, y se creyó inicialmente que los genes eran proteínas. La primera evidencia que llevó a la identificación del ADN como material genético llegó de estudios en bacterias. Estos experimentos representan el prototipo de los abordajes actuales para definir la función de los genes basados en la introducción de secuencias de ADN en las células, como será expuesto más adelante en este capítulo.

Los experimentos que definieron el papel del ADN se derivaron de estudios sobre la bacteria que causa la neumonía (*Pneumococcus*). Las cepas virulentas de *Pneumococcus* están rodeadas de una cápsula de polisacárido que protege a la bacteria del ataque del sistema inmune del huésped. Dado que la cápsula da a las colonias un aspecto liso en el medio de cultivo, las cepas encapsuladas se denominan S. Las cepas mutantes que han perdido la capacidad de sintetizar la cápsula forman colonias con el borde rugoso (denominadas R) y no son letales cuando se inoculan en el ratón. En 1928 se observó que los ratones inoculados con bacterias no encapsuladas (R) y bacterias encapsuladas (S) inactivadas con calor desarrollaron neumonía y murieron. Conviene reseñar que las bacterias aisladas en estos ratones eran del tipo S. Experimentos posteriores mostraron que un extracto de bacterias de tipo S libre de células era igualmente capaz de convertir (o transformar) bacterias R al estado S. Por lo tanto, una sustancia en el extracto S (llamado principio transformador o transformante) era responsable de inducir la **transformación** genética de bacteria R a S.

En 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty establecieron de forma doble que el principio transformador era ADN, purificándolo de extractos bacterianos y demostrando que su actividad desaparece tras la digestión enzimática del ADN y no tras la digestión enzimática de las proteínas (**Fig. 4.4**). Pese a que estos estudios no llevaron a la aceptación inmediata del ADN como material genético, fueron ampliados unos pocos años después con experimentos con virus bacterianos. En particular, se observó que cuando un virus infectaba a una célula era preciso que el ADN viral penetrara en la célula (pero no las proteínas) para que el virus se replicara.

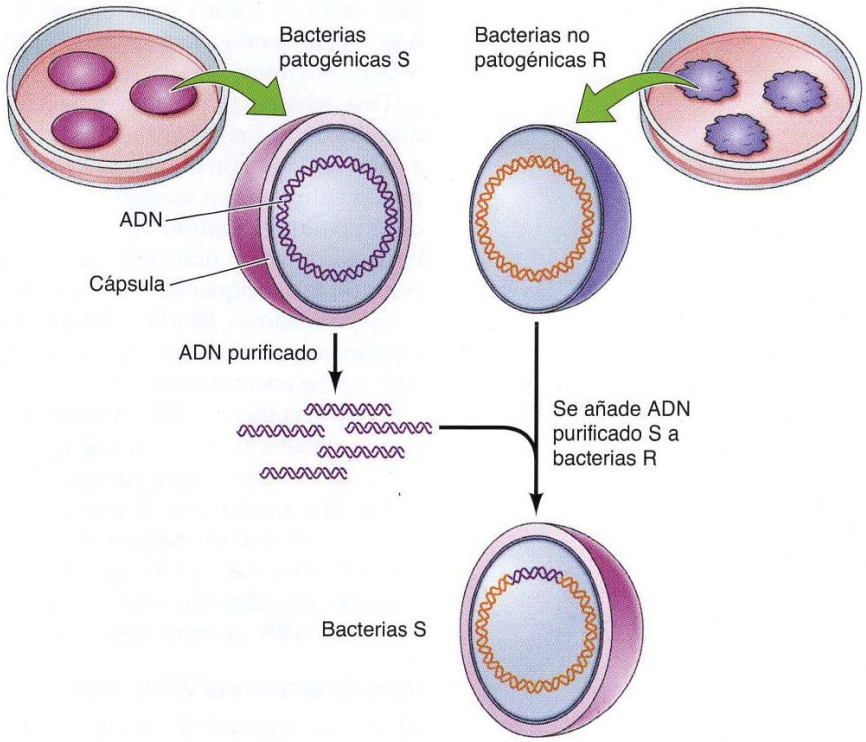


FIGURA 4.4 Transferencia de información genética por el ADN. Se extrae el ADN de una cepa patogénica de *Pneumococcus*, rodeado de una cápsula y que forma colonias lisas (S). Si se añade este ADN purificado S a un cultivo de *Pneumococcus* no patogénicos, que no forman cápsula y que forman colonias rugosas (R), se transforman a la forma S. Por lo tanto, el ADN purificado contiene la información genética responsable de la transformación de bacterias R en S.

Además, a las partículas virales hijas se transmite el ADN del virus progenitor y no sus proteínas. La concurrencia de estos resultados junto con estudios posteriores de la actividad del ADN en la transformación bacteriana llevó a la aceptación de la idea de que el ADN es el material genético.

ANIMACIÓN 4.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.1

Transformación bacteriana. Una cepa no patogénica de *Pneumococcus* puede ser transformada en una cepa patogénica mediante la incorporación de fragmentos de ADN procedentes de una cepa patogénica y de su incorporación en su cromosoma.

Estructura del ADN

La comprensión de la estructura tridimensional del ADN, deducida en 1953 por James Watson y Francis Crick, ha sido la base para la biología molecular actual. En la época de los trabajos de Watson y Crick se sabía que el ADN era un polímero compuesto de cuatro nucleótidos —dos purinas (adenina [A] y guanina [G]) y dos pirimidinas (citosina [C] y timina [T])— unidas a azúcares fosforilados. Dado el papel central del ADN como material genético, la elucidación de su estructura tridimensional parecía crítica para entender su función. El enfoque de Watson y Crick del problema estuvo muy influenciado por la descripción de Linus Pauling de las uniones por puentes de hidrógeno y la α-hélice, un tipo común de estructura secundaria de las proteínas (véase el Cap. 2). Se obtuvo además información experimental sobre la estructura del ADN con los estudios de cristalografía por refracción de rayos X llevados a cabo por Maurice Wilkins y Rosalind Franklin. El análisis de estos datos reveló que el ADN es una hélice que da un giro cada 3,4 nm, y que la distancia entre bases es de 0,34 nm, por lo que en cada vuelta de la hélice hay diez bases. Un dato importante es que el diámetro de la hélice es de 2 nm, sugiriendo que está compuesto no de una sino de dos cadenas de ADN.

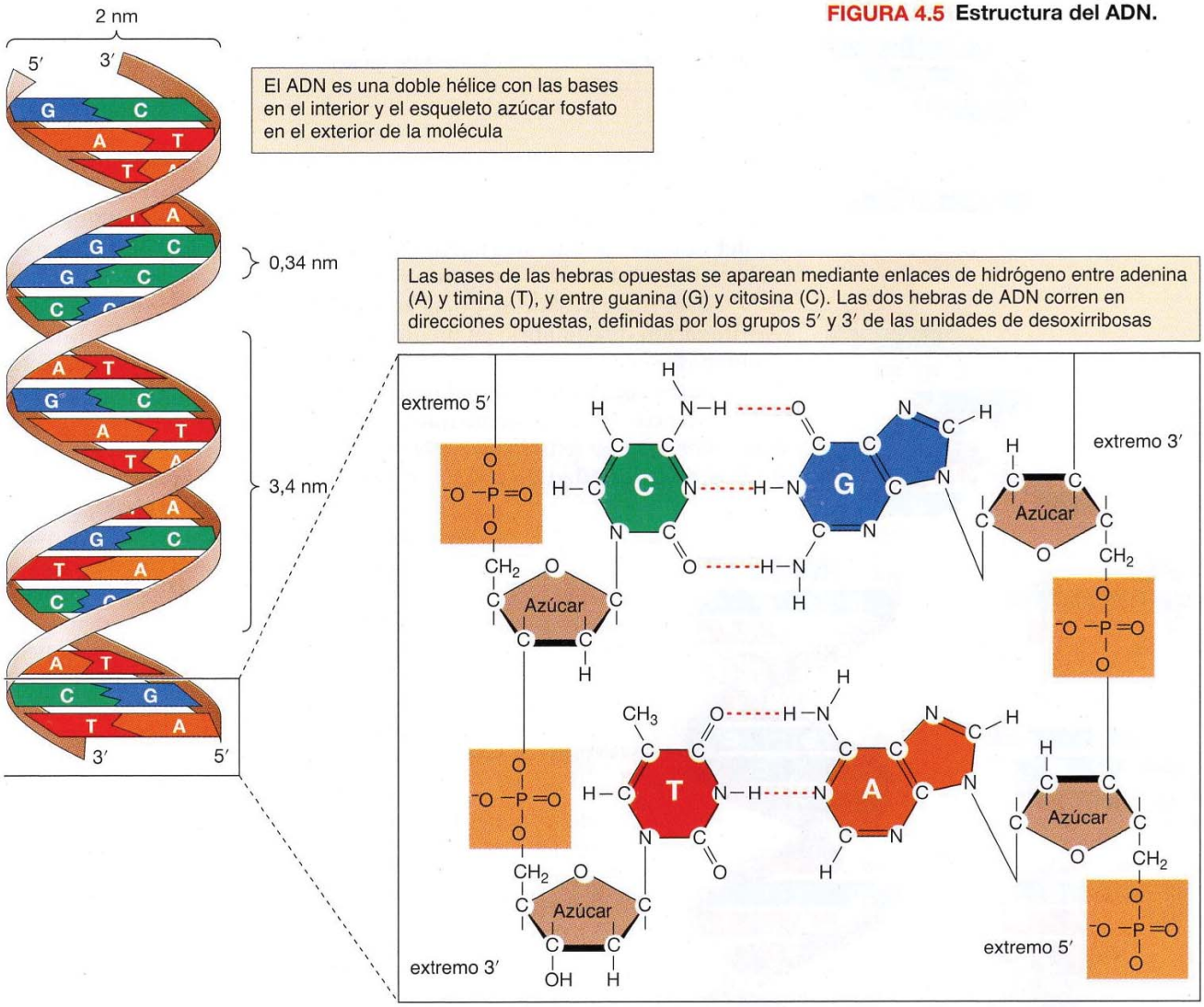
A partir de estos datos Watson y Crick construyeron su modelo del ADN (**Fig. 4.5**). La principal característica es que se trata de una doble hélice con el esqueleto azúcar-fosfato en el exterior de la molécula. Las bases están en el interior, orientadas de tal forma que se forman enlaces de hidrógeno entre purinas y pirimidinas de cadenas opuestas. El apareamiento de las bases es muy específico: A siempre se empareja con T y G con C. Esta especificidad explica los resultados previos de Erwin Chargaff, quien analizó la com-

ANIMACIÓN 4.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.2

Avery, MacLeod y McCarty. A través de una serie de experimentos en 1944, Oswald Avery, Colin MacLeod, y Maclyn McCarty establecieron que el principio transformante (material genético) es el ADN.

FIGURA 4.5 Estructura del ADN.



◆ La estructura del ADN descrita por Watson y Crick fue un notable logro, pero no perfecto. En su publicación inicial, asumieron que tanto A-T como G-C estaban asociados mediante dos puentes de hidrógeno, no percatándose del tercer puente de hidrógeno en los pares G-C.

posición de diversos ADN y encontró que la cantidad de adenina era siempre equivalente a la de timina, y la cantidad de citosina a la de guanina. A causa de esta especificidad en el apareamiento de bases las dos hebras de ADN son complementarias: cada hebra contiene toda la información necesaria para especificar la secuencia de bases de la otra.

Replicación del ADN

El descubrimiento de la especificidad en el apareamiento de las bases entre las dos hebras del ADN sugirió de forma inmediata una solución para la cuestión de cómo el material genético dirige su propia replicación —un proceso que es necesario cada vez que la célula se divide—. Se propuso que las dos hebras de la molécula de ADN se podrían separar y servir como moldes para la síntesis de nuevas hebras complementarias, cuya secuencia sería dictada por la especificidad en el apareamiento de bases (**Fig. 4.6**). El proceso se denomina **replicación semiconservativa** porque una hebra de ADN progenitor se conserva en cada una de las dos moléculas hijas de ADN.

En 1958 se obtuvo apoyo directo para la teoría de la replicación semiconservativa del ADN gracias a una serie de atractivos experimentos llevados a

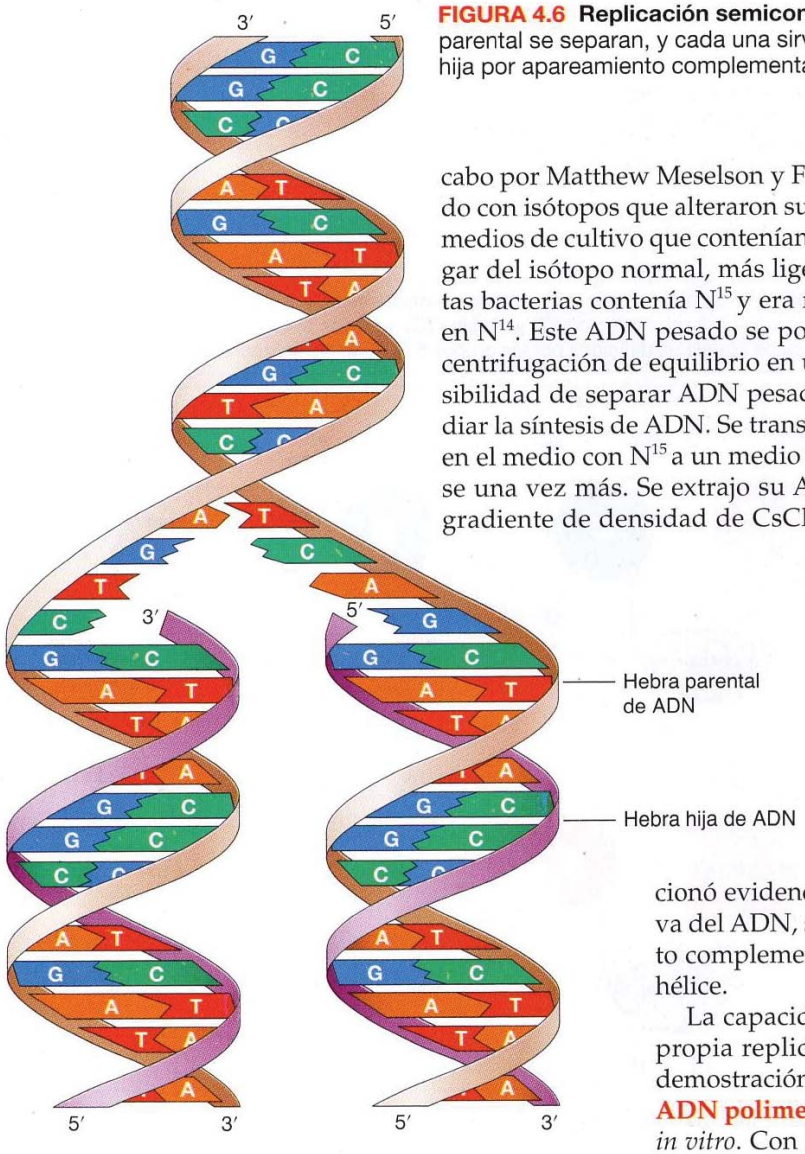


FIGURA 4.6 Replicación semiconservativa del ADN. Las dos hebras de ADN parental se separan, y cada una sirve como molde para la síntesis de una hebra hija por apareamiento complementario de bases.

cabo por Matthew Meselson y Frank Stahl, en los cuales el ADN fue marcado con isótopos que alteraron su densidad (**Fig. 4.7**). Se hizo crecer *E. coli* en medios de cultivo que contenían el isótopo pesado del nitrógeno (N^{15}) en lugar del isótopo normal, más ligero (N^{14}). Consecuentemente el ADN de estas bacterias contenía N^{15} y era más pesado que el de las bacterias crecidas en N^{14}. Este ADN pesado se podía separar del ADN que contenía N^{14} por centrifugación de equilibrio en un gradiente de densidad de CsCl. Esta posibilidad de separar ADN pesado (N^{15}) de ADN ligero (N^{14}) permitió estudiar la síntesis de ADN. Se transfirieron células de *E. coli* que habían crecido en el medio con N^{15} a un medio que contenía N^{14}, y se les permitió replicarse una vez más. Se extrajo su ADN y se analizó por centrifugación en un gradiente de densidad de CsCl. Los resultados de este análisis indicaron que todo el ADN pesado había sido reemplazado por ADN de nueva síntesis con una densidad intermedia entre el de las moléculas de ADN pesada (N^{15}) y ligera (N^{14}). El significado es que durante la replicación las dos hebras de ADN parental pesado se separan y sirven de moldes para la síntesis de hebras hijas de ADN ligero, produciendo moléculas de doble hebra de densidad intermedia. Este experimento proporcionó evidencia directa de la replicación semiconservativa del ADN, subrayando la importancia del apareamiento complementario de bases entre las hebras de la doble hélice.

La capacidad del ADN para servir de molde para su propia replicación fue establecida más adelante con la demostración de que una enzima purificada de *E. coli* (la **ADN polimerasa**) podía catalizar la replicación del ADN *in vitro*. Con la presencia de ADN como molde, la ADN polimerasa era capaz de dirigir la incorporación de nucleótidos en una molécula del ADN complementaria.

Expresión de la información genética

Los genes actúan determinando la estructura de las proteínas, que son responsables de dirigir el metabolismo celular a través de su función como enzimas. La identificación del ADN como el material genético y la elucidación de su estructura revelaron que la información genética se especifica por el orden de las cuatro bases (A, C, G y T) que constituyen la molécula de ADN. Las proteínas son polímeros de 20 aminoácidos, cuya secuencia determina su estructura y función. La primera relación directa entre una mutación genética y una alteración en la secuencia de aminoácidos de una proteína se estableció en 1957, cuando se descubrió que los pacientes con una enfermedad hereditaria denominada anemia de células falciformes poseen moléculas de hemoglobina que difieren de las normales en una sola sustitución de un aminoácido. Se obtuvo un entendimiento más profundo de la relación molecular entre ADN y proteínas tras una serie de experimentos que tomaron como modelos genéticos a *E. coli* y sus virus.

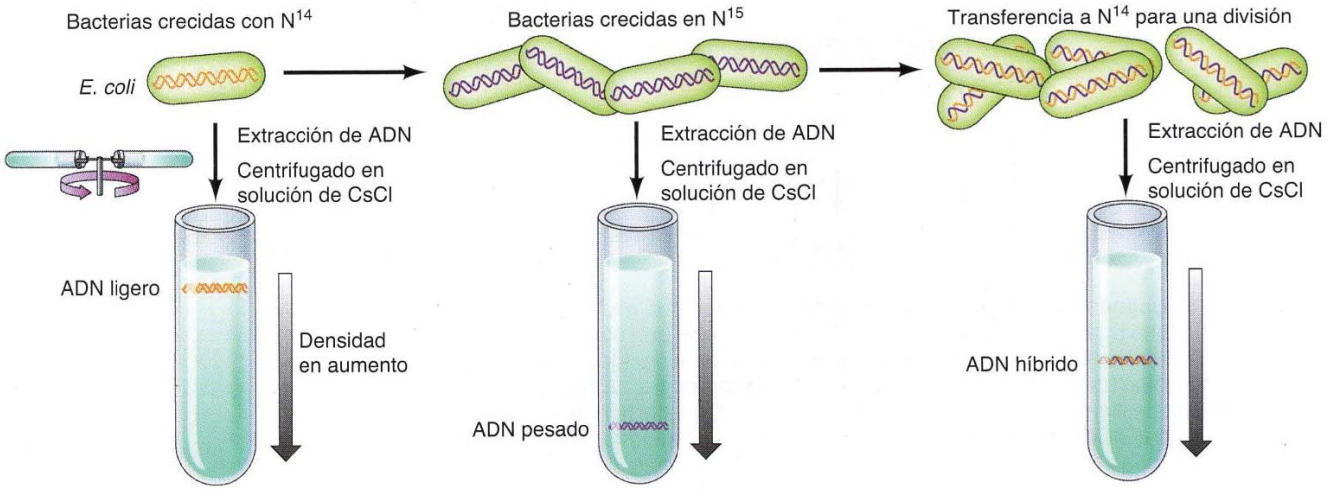


FIGURA 4.7 Demostración experimental de la replicación semiconservativa. Se transfieren bacterias que han sido cultivadas en un medio con el isótopo normal del nitrógeno (N^{14}) a un medio que contiene un isótopo pesado (N^{15}) y se dejan crecer durante varias generaciones. Se transfieren de nuevo a un medio que sólo contiene N^{14} y se dejan crecer durante una generación adicional. Se extrae su ADN y se analiza por centrifugación de equilibrio con una solución del CsCl, el cual sedimenta formando un gradiente de densidad. Las moléculas de ADN se depositan a una altura a la que su densidad es equivalente a la del CsCl. El ADN de la bacteria crecida en N^{15} que fue transferida para un único ciclo en N^{14} se deposita a una altura intermedia entre las del ADN de bacterias cultivadas exclusivamente en N^{14} y N^{15}. Esto significa que es una molécula híbrida con una hebra ligera y otra pesada.

Colinealidad de genes y proteínas

La hipótesis más simple para entender la relación entre genes y enzimas era que el orden de los nucleótidos en el ADN especificaba el orden de aminoácidos en la proteína. Las mutaciones en un gen se corresponderían con alteraciones en la secuencia de ADN, que resultarían de la sustitución de un nucleótido por otro o de la adición o delección de nucleótidos. Estos cambios en la secuencia de nucleótidos producirían los cambios correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen en cuestión. Esta hipótesis predecía que distintas mutaciones en el mismo gen alterarían distintos aminoácidos en la proteína codificada, y que las posiciones de las mutaciones en un gen se reflejarían en las posiciones de las alteraciones en los aminoácidos a lo largo de su producto proteínico.

La rapidez de replicación y la simplicidad del sistema genético de *E. coli* fueron de gran ayuda para abordar estas cuestiones. Se pueden aislar una gran variedad de mutantes, incluidas mutaciones nutricionales que (de igual modo que las mutaciones de *Neurospora* discutidas previamente) requieren determinados aminoácidos para crecer. El rápido crecimiento de *E. coli* hizo posible el aislamiento y mapeo de mutaciones múltiples en el mismo gen, llevando a la primera demostración de la relación lineal entre genes y proteínas. En estos estudios, Charles Yanofsky y sus colaboradores mapearon una serie de mutaciones en el gen que codifica una enzima necesaria para la síntesis del aminoácido triptófano. El análisis de las enzimas codificadas por los genes mutantes reveló que las posiciones relativas de los aminoácidos alterados eran las mismas que las de las mutaciones correspondientes (**Fig. 4.8**). Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos en la proteína es colineal con la de mutaciones en el gen, como es de esperar si el orden de nucleótidos en el ADN especifica el orden de aminoácidos en la proteína.

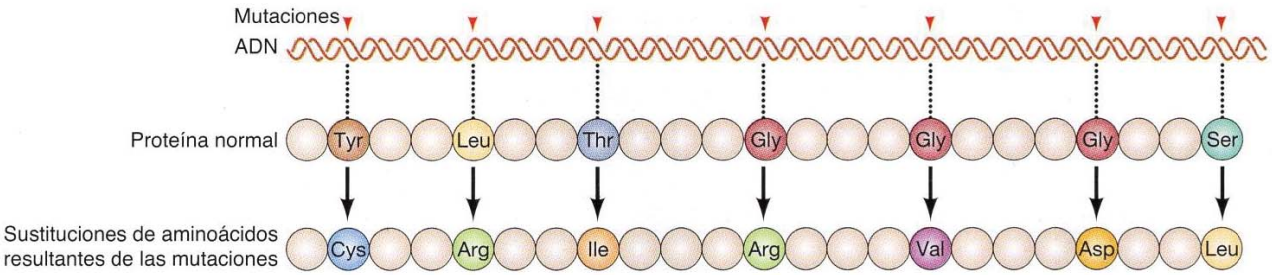


FIGURA 4.8 Colinealidad de genes y proteínas. Una serie de mutaciones (puntas de flecha rojas) fueron mapeadas en el gen de *E. coli* que codifica la triptófano sintetasa (línea superior). Las sustituciones de aminoácidos resultantes de cada mutación fueron determinadas por secuenciación de las proteínas de la bacteria mutante (línea inferior). Estos análisis revelaron que el orden de las mutaciones en el ADN era el mismo que el orden de las sustituciones de aminoácidos en la proteína codificada.

Papel del ARN mensajero

Aunque la secuencia de nucleótidos en el ADN parecía especificar el orden de los aminoácidos en las proteínas, eso no significaba necesariamente que el ADN dirigiera por sí mismo la síntesis de proteínas. De hecho, no parecía ser el caso, dado que el ADN se localiza en el núcleo de las células eucarióticas, mientras que la síntesis proteínica se lleva a cabo en el citoplasma. Era necesaria otra molécula para llevar la información genética del ADN a los sitios donde se realiza la síntesis de proteínas (los ribosomas).

El ARN se antojaba un buen candidato para ser dicho intermediario porque la similitud de su estructura con la del ADN sugería que el ARN podía ser sintetizado a partir de un molde de ADN (**Fig. 4.9**). El ARN difiere del ADN en que se compone de una cadena única en vez de ser de doble cadena, sus azúcares son ribosas en vez de desoxirribosas y contiene la base pirimidínica uracilo (U) en vez de timina (T) (véase Fig. 2.10). Sin embargo, ni el cambio de azúcar ni la sustitución de U por T altera el apareamiento de las bases, por lo que la síntesis de ARN puede ser realizada de manera directa sobre un molde de ADN. Además, dado que el ARN se localiza primariamente en el citoplasma, parecía un intermediario lógico para transferir la información del ADN a los ribosomas. Estas características del ARN sugirieron una vía para el flujo de información genética que se conoce como el **dogma central** de la biología molecular:

$$\text{ADN} \rightarrow \text{ARN} \rightarrow \text{Proteína}$$

De acuerdo con este concepto, las moléculas de ARN se sintetizan a partir de moldes de ADN (un proceso llamado **transcripción**), y las proteínas se sintetizan a partir de moldes de ARN (un proceso denominado **traducción**).

La evidencia experimental sobre la intermediación del ARN postulada por el dogma central fue obtenida por Sidney Brenner, François Jacob y Matthew Meselson en estudios de *E. coli* infectados por el bacteriófago T4. La síntesis de ARN de *E. coli* se interrumpe tras la infección por el bacteriófago T4, después de lo cual el único ARN de nueva síntesis en bacterias infectadas es transcrito a partir del ADN del T4. Este ARN del T4 se une a ribosomas bacterianos, transfiriendo la información del ADN al lugar donde se realiza la síntesis proteínica. Debido a su función como intermediarios en el flujo de información genética, las moléculas de ARN que sirven de moldes para la síntesis proteínica se denominan **ARN mensajeros** (**ARNm**). Son transcritos por una enzima (**ARN polimerasa**) que cataliza la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN.

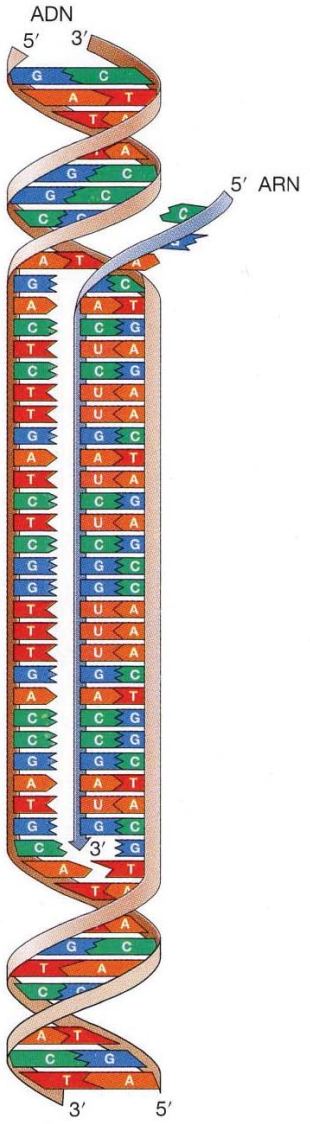


FIGURA 4.9 Síntesis de ARN a partir de ADN. Las dos hebras de ADN se desenrollan, y una es usada como molde para la síntesis de una hebra de ARN.

ANIMACIÓN 4.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.3

El «Dogma Central». El dogma central de la biología molecular, como fue enunciado por primera vez por Francis Crick, afirma que la información fluye del ADN al ARN, y después del ARN a la proteína.

Aparte del ARNm, existen otros dos tipos de moléculas de ARN que son importantes en la síntesis proteínica. El **ARN ribosómico** (**ARNr**) es un componente de los ribosomas, y el **ARN de transferencia** (**ARNt**) funciona como una molécula adaptadora que alinea los aminoácidos a lo largo del molde de ARNm. La estructura y función de estas moléculas se tratan en la siguiente sección y en mayor detalle en los Capítulos 8 y 9.

Código genético

¿Cómo se traduce la secuencia de nucleótidos del ARNm a la secuencia de aminoácidos de una proteína? En este escalón de la expresión génica se transfiere información genética entre macromoléculas químicamente no relacionadas —ácidos nucleicos y proteínas— y plantea dos nuevos problemas para entender la acción de los genes.

Primero, dado que los aminoácidos no se relacionan estructuralmente con las bases de los ácidos nucleicos, el apareamiento complementario directo entre las bases del ARNm y los aminoácidos durante la incorporación de éstos a las proteínas parecía imposible. ¿Cómo se alineaban entonces los aminoácidos sobre el molde de ARNm durante la síntesis proteínica? Esta cuestión se aclaró con el descubrimiento de que los ARNt sirven de adaptadores entre los aminoácidos y el ARNm durante la traducción **(Fig. 4.10)**. Previamente a su utilización en la síntesis proteínica, cada aminoácido se une a su ARNt por medio de una enzima específica. El apareamiento de bases entre una secuencia de reconocimiento del ARNt y una secuencia complementaria en el ARNm dirige al aminoácido a su posición correcta en el molde de ARNm.

El segundo problema para traducir una secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos era la determinación del **código genético**. ¿Cómo se podría transferir la información contenida en una secuencia nucleotídica de cuatro elementos a la secuencia de 20 aminoácidos distintos que compone las proteínas? Dado que cuatro nucleótidos deben codificar 20 aminoácidos, son precisos al menos tres nucleótidos para codificar cada aminoácido. Tomados individualmente, los cuatro nucleótidos sólo pueden codificar cuatro aminoácidos, y tomados en parejas cuatro nucleótidos sólo codifican dieciséis (4^2) aminoácidos. Sin embargo, tomados de tres en tres cuatro nucleótidos podrían codificar 64 (4^3) aminoácidos distintos —más que suficiente para los 20 aminoácidos existentes en las proteínas.

La evidencia experimental directa se obtuvo en estudios con el bacteriófago T4, portador de mutaciones en un gen conocido detalladamente, llamado *rII*. Los fagos con mutaciones en este gen forman placas anormalmente grandes, que son fácilmente distinguibles de las formadas por fagos del tipo salvaje. Por lo tanto, fue sencillo aislar y mapear un cierto número de estas mutaciones en el *rII*, lo cual llevó al establecimiento de un detallado mapa genético de este *locus*. El estudio de las recombinaciones entre mutantes del gen *rII* que surgieron por adiciones o deleciones de nucleótidos reveló que los fagos que contenían adiciones o deleciones de uno o dos nucleótidos siempre mostraban el fenotipo mutante. Sin embargo, los fagos que contenían adiciones o deleciones de tres nucleótidos eran funcionalmente del tipo salvaje (**Fig. 4.11**). Estos hallazgos sugirieron que el gen se lee en grupos de tres nucleótidos, empezando a partir de un punto fijo. Adiciones o deleciones de uno o dos nucleótidos alterarían el marco de lectura

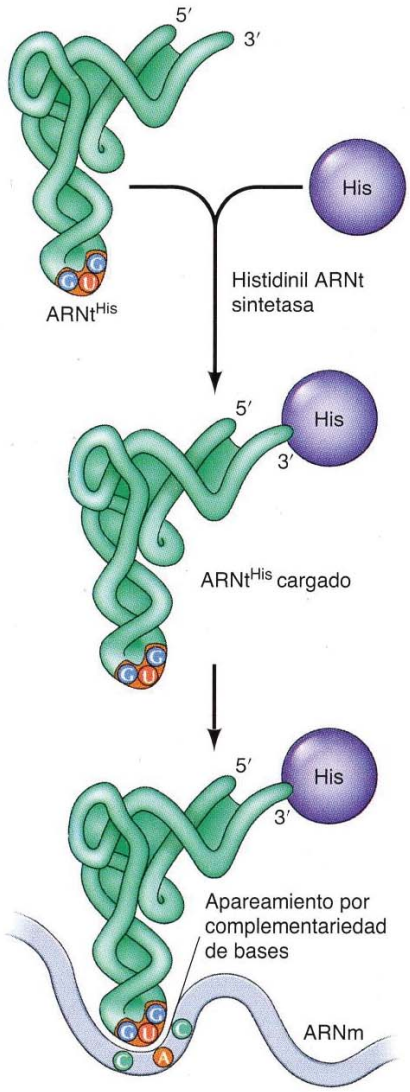


FIGURA 4.10 Función del ARN de transferencia. El ARN de transferencia sirve como un adaptador durante la síntesis proteica. Cada aminoácido (p. ej., histidina) se une al extremo 3' de un ARNt por una enzima apropiada (una aminoacil ARNt sintetasa). El ARNt cargado se alinea sobre un molde de ARNm por complementariedad de bases.

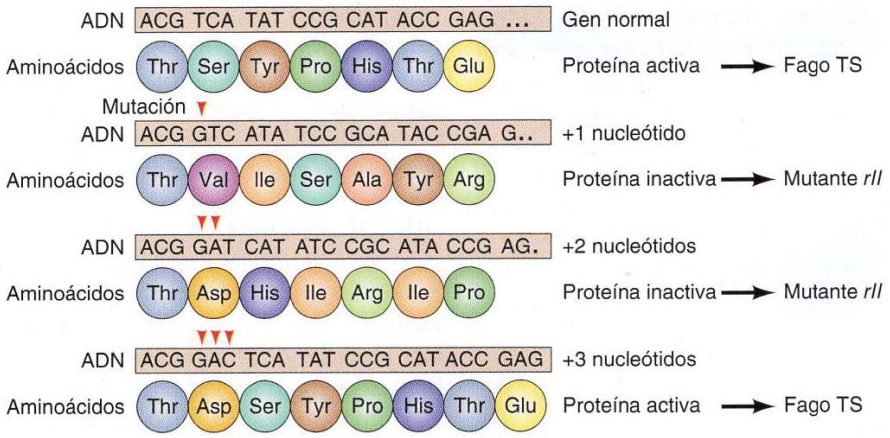


FIGURA 4.11 Evidencia genética del código de tripletes. Fueron estudiadas una serie de mutaciones que consistían en la adición de uno, dos o tres nucleótidos en el gen *rII* del bacteriófago T4. La adición de uno o dos nucleótidos altera el marco de lectura de todo el resto del gen. Por lo tanto, todos los aminoácidos son anormales y se produce una proteína inactiva, dando lugar a un fago mutante. La adición de tres nucleótidos, por el contrario, altera un único aminoácido. El marco de lectura del resto del gen es normal, y se produce una proteína activa que da lugar al fago de tipo salvaje (TS).

de todo el gen, llevando a la codificación de aminoácidos anormales a lo largo de toda la proteína. Por el contrario, la adición o deleción de tres nucleótidos lleva a la adición o deleción de un solo aminoácido; el resto de la secuencia aminoacídica permanece inalterada, produciendo frecuentemente una proteína activa.

El desciframiento del código genético se convirtió en un problema de asignar tripletes de nucleótidos a sus correspondientes aminoácidos. La aproximación al problema consistió en el uso de sistemas *in vitro* que realizaran síntesis proteínica (**traducción *in vitro***). Se sabía que los extractos celulares que contienen ribosomas, aminoácidos, ARNt y las enzimas responsables de unir a los aminoácidos con su correspondiente ARNt (aminoacil-ARNt sintetasas) son capaces de catalizar la incorporación de aminoácidos a las proteínas. Sin embargo, esa síntesis de proteínas depende de la presencia de ARNm unido a los ribosomas, y es posible añadir ARNm purificado a la síntesis proteica directa en ese tipo de sistemas. Esto permitió descifrar el código genético mediante el estudio de la traducción de ARNm sintéticos con una secuencia de bases conocida.

El primero de dichos experimentos, llevado a cabo por Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei, consistió en la traducción *in vitro* de un polímero de ARN que únicamente contenía uracilo (**Fig. 4.12**). Este molde de poli-U dirigió la incorporación de un único aminoácido —fenilalanina— en un polipéptido formado por residuos repetidos de fenilalanina. Por tanto, el triplete UUU codifica el aminoácido fenilalanina. Experimentos similares con polímeros de ARN compuestos de un único nucleótido establecieron que AAA codifica la lisina y CCC codifica la prolina. El resto del código fue descifrado utilizando polímeros de ARN compuestos de mezclas de nucleótidos, llevando a la asignación de los 64 posibles tripletes (denominados **codones**) (**Tabla 4.1**). De los 64 codones, 61 codifican algún aminoácido; los tres restantes (UAA, UAG y UGA) son codones de parada o *stop* que señalizan la terminación de la síntesis proteínica. El código está degenerado, dado que muchos aminoácidos están codificados por más de un codón. Con pocas excepciones (discutidas en el Cap. 12), todos los organismos utilizan el mismo código genético, apoyando con fuerza la conclusión de que todas las células actuales han evolucionado a partir de un ancestro común.

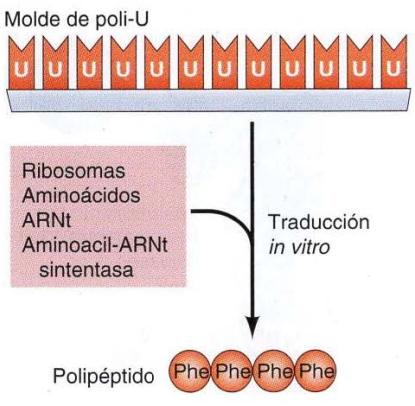


FIGURA 4.12 El triplete UUU codifica a la fenilalanina. La traducción *in vitro* de un ARN sintético compuesto de uracilos repetidos (un molde de poli-U) lleva a la síntesis de un polipéptido compuesto únicamente por fenilalanina.

ANIMACIÓN 4.4

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.4

Mutaciones del ADN. Una mutación en un par de bases de la región codificante de un gen puede resultar en un polipéptido prematuramente terminado o en un polipéptido con una secuencia aminoacídica errónea, dependiendo de la mutación concreta.

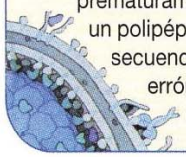


TABLA 4.1 El código genético

Primera posición	Segunda posición U	C	A	G	Tercera posición
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	stop	stop	A
	Leu	Ser	stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Virus ARN y transcripción inversa

Con el esclarecimiento del código genético, los principios fundamentales de la biología molecular celular parecían estar establecidos. De acuerdo con el dogma central, el material genético es el ADN, que es capaz de autorreplicarse además de transcribirse a ARNm, que sirve a su vez de molde para la síntesis proteínica. Sin embargo, como fue expuesto en el Capítulo 1, muchos virus contienen ARN en vez de ADN como material genético, lo cual implica la existencia de otros modos de transferencia de información.

Los genomas de ARN fueron descubiertos en primer lugar en virus vegetales, muchos de los cuales se componen únicamente de ARN y proteínas. En los años 50 se obtuvo evidencia directa de que el ARN actúa como material genético por medio de experimentos que demostraron que el ARN purificado del virus del mosaico del tabaco podía infectar nuevas células, dando lugar a una progenie de virus infectivos. El modo de replicación de la mayoría de los genomas virales ARN se determinó posteriormente en estudios de los bacteriófagos ARN de *E. coli*. Estos virus codifican una enzima específica que cataliza la síntesis de ARN a partir de un molde de ARN (síntesis de ARN dirigida por ARN), utilizando el mismo mecanismo de apareamiento de bases entre hebras complementarias que se da durante la replicación del ADN o durante la transcripción de ARN a partir de ADN.

Aunque la mayoría de los virus animales, como el poliovirus o el virus influenza, se observó que se replicaban por síntesis de ARN dirigida por ARN, este mecanismo no parecía explicar la replicación de una familia de virus animales (los virus ARN tumorigénicos), que eran de especial interés debido a su capacidad de causar cáncer en animales infectados. Pese a que estos virus contienen ARN genómico en las partículas virales, los experimentos llevados a cabo por Howard Temin en los años 60 indicaron que se requería síntesis de ADN en las células infectadas para completar su ciclo vital, llevando a la hipótesis de que los virus tumorales de ARN (denominados actualmente **retrovirus**) se replicaban por medio de la síntesis de un ADN intermediario, lla-

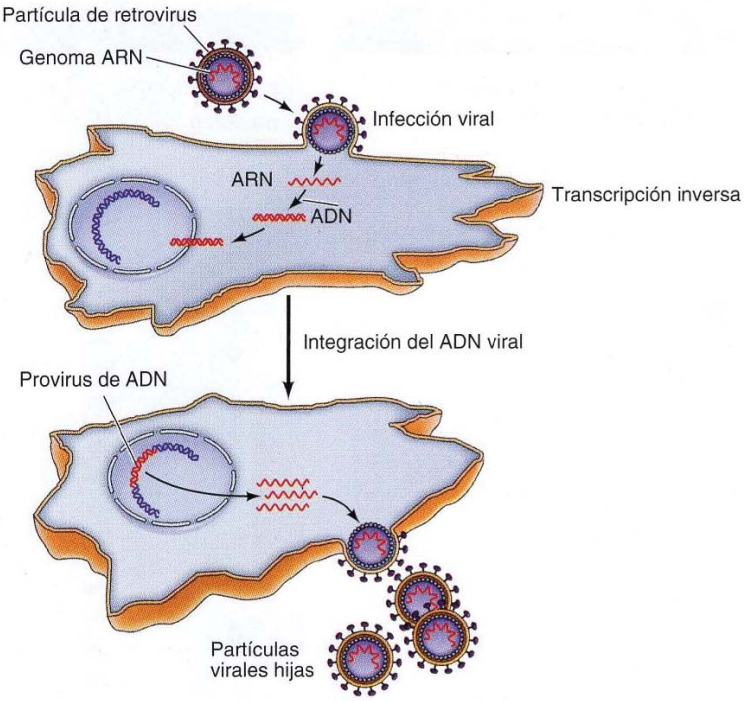


FIGURA 4.13 Transcripción inversa y replicación de retrovirus. Los retrovirus contienen genomas de ARN en sus partículas virales. Cuando un retrovirus infecta una célula huésped se sintetiza una copia de ADN del ARN viral por medio de la transcriptasa inversa. Este ADN viral se integra en el ADN cromosómico del huésped para constituir un provirus de ADN, que se transcribe para dar lugar a virus ARN hijos.

mado provirus de ADN (**Fig. 4.13**). Esta hipótesis fue recibida inicialmente con incredulidad generalizada dado que implica la síntesis de ADN dirigida por ARN —una inversión del dogma central de la biología molecular—. Sin embargo, en 1970 Howard Temin y David Baltimore descubrieron de forma independiente que el retrovirus contenía una enzima que cataliza la síntesis de ADN desde un molde de ARN. Adicionalmente se obtuvo evidencia fehaciente de la existencia de secuencias de ADN viral en las células infectadas. La síntesis de ADN a partir de ARN, ahora denominada **transcripción inversa**, fue establecida como un nuevo modo de transferencia de información en sistemas biológicos.

La transcripción inversa es importante no sólo en la replicación de los retrovirus sino también en al menos otros dos aspectos de la biología molecular y celular. Primero, la transcripción inversa no es exclusiva de los retrovirus; ocurre también en las células, como se indica en los Capítulos 6 y 7. Por ejemplo, la transcripción inversa es crucial para replicar los extremos de los cromosomas eucariotas. Además, la transcripción inversa es a menudo la responsable de la transposición de secuencias de ADN de un lugar a otro del cromosoma. De hecho, la secuencia del genoma humano ha revelado que aproximadamente el 40% del ADN genómico humano deriva de la transcripción inversa. Segundo, las enzimas que catalizan la síntesis de ADN dirigida por ARN (**transcriptasas inversas**) se utilizan experimentalmente para generar copias de ADN a partir de una molécula de ARN. El uso de la transcriptasa inversa ha permitido el estudio del ARNm de células eucarióticas por medio de los métodos moleculares de manipulación del ADN utilizados actualmente, como será expuesto en la siguiente sección.

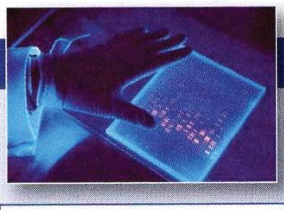
ANIMACIÓN 4.5

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.5

Reproducción del VIH. Como parte de un ciclo de replicación en el interior de una célula hospedadora, un retrovirus emplea la enzima transcriptasa inversa para copiar su genoma ARN en ADN.

ADN recombinante

Los experimentos clásicos en biología molecular fueron llamativamente exitosos en el desarrollo de los conceptos fundamentales sobre la naturaleza y expresión de los genes. Dado que estos estudios se basaron en el análisis ge-



EXPERIMENTO CLAVE

Hipótesis del provirus de ADN

Naturaleza del provirus del sarcoma de Rous
Howard M. Temin
Laboratorio McArdle, Universidad de Wisconsin, Madison, WI
Monográficos del National Cancer Institute. Volumen 17, 1964, págs. 557-570

Howard M. Temin

Contexto

El virus del sarcoma de Rous (VSR), el primer virus inductor de cáncer descrito, era de considerable interés como sistema experimental para el estudio de la biología molecular del cáncer. Howard Temin comenzó su investigación en esta área cuando, como estudiante de graduado en 1958, desarrolló el primer método para la transformación de células normales en células cancerosas tras su infección por el VSR. La disponibilidad de un método cuantitativo *in vitro* proporcionó la herramienta necesaria para estudios posteriores de transformación celular y replicación viral. Mientras Temin realizaba dichos estudios, elaboró una serie de inesperadas observaciones que indicaron que la replicación de VSR era básicamente distinta de la del resto del virus ARN. Estos experimentos llevaron a Temin a proponer la hipótesis del provirus de ADN, que afirmaba que el ARN viral se copiaba a ADN en las células infectadas —una propuesta que iba directamente en contra del universalmente aceptado dogma central de la biología molecular.

Experimentos

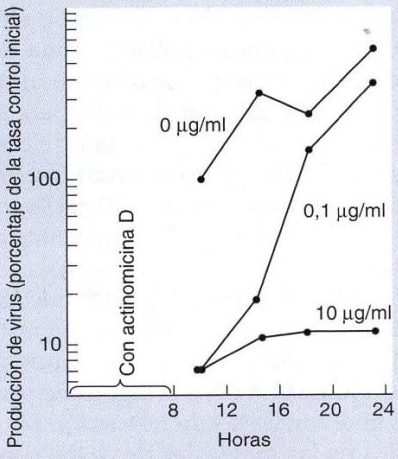
La hipótesis del provirus de ADN se basaba en evidencia experimental de diversas fuentes. En primer lugar, los estudios de transformación celular utilizando mutantes de VSR indicaron que la información genética del virus determinaba importantes características en las células hijas tras cada división, incluso en ausencia de replicación viral. Temin propuso que el genoma viral estaba presente en las células infectadas en una forma estable y heredable, que denominó provirus.

La evidencia de que el provirus se compone de ADN se derivó de experimentos con inhibidores metabólicos. La actinomicina D, que inhibe la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN, interfería con la producción de virus en células infectadas por el VSR (véase figura). Por otro lado, los inhibidores de la síntesis de ADN inhibían estadios precoces de la infección celular por VSR. Esto puso de manifiesto que se requería síntesis de ADN al principio de la infección y síntesis de ARN dirigida por ADN para producir virus hijos, lo cual llevó a la propuesta de que el provirus era una copia de ADN del genoma ARN viral. Temin trató de aportar más evidencia utilizando hibridación de ácidos nucleicos para detectar secuencias virales en el ADN de células infectadas, pero la sensibilidad de las técnicas disponibles era limitada y los datos no fueron convincentes.

Impacto

La hipótesis del provirus de ADN se propuso basándose en experimentos genéticos y en los efectos de inhibidores metabólicos. Era una propuesta radical que contradecía el aceptado dogma central de la biología molecular. En este contexto, la hipótesis de Temin de que el VSR se replicaba transfiriendo su información de ARN a ADN no sólo no fue aceptada por la comunidad científica, sino que fue recibida con sorna generalizada. Sin embargo, Temin continuó durante los años 60 sus experimentos tratando de aportar una evidencia más convincente para su hipótesis. Sus esfuerzos culminaron en 1970 con el descubrimiento por Temin y Satoshi Mizutani, e independientemente por David Baltimore, de una enzima viral, conocida ahora como transcriptasa inversa, que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN —una demostración bioquímica inequívoca de que el dogma central podía invertirse.

Temin concluyó su artículo de 1970 con la afirmación de que los resultados «constituyen una fuerte evidencia de que la hipótesis del provirus de ADN es correcta y que los virus tumorales de ARN tienen un genoma de ADN cuando están dentro de las células y un genoma de ARN cuando están en forma de viriones. Estos resultado pueden tener importantes implicaciones en la carcinogénesis de origen viral y posiblemente en los modelos de transferencia de información en otros sistemas biológicos». Como predijo Temin, el descubrimiento de la síntesis de ADN dirigida por ARN ha llevado a importantes avances en el entendimiento del cáncer, los retrovirus humanos y el reordenamiento genético. La transcriptasa inversa se ha convetido en una herramienta crítica para clonar el ADN, repercutiendo virtualmente en todas las áreas de la biología celular y molecular contemporánea.



Efecto de la actinomicina D sobre la replicación del RSV. Las células infectadas con RSV fueron cultivadas con las concentraciones indicadas de actinomicina D durante 8 horas. La actinomicina D entonces fue eliminada y la cantidad de virus producidos fue determinada.

nético, su éxito dependía en gran medida en la elección como modelos de organismos simples y de rápida replicación (como las bacterias y los virus). Sin embargo, no estaba claro cómo se podrían generalizar estos principios fundamentales para proporcionar un entendimiento molecular de la complejidad de las células eucarióticas, teniendo en cuenta que los genomas de la mayoría de los eucariotas (p. ej., el genoma humano) son hasta mil veces más largos que el de *E. coli*. A principios de los años 70 el panorama de estudiar dichos genomas a un nivel molecular era desalentador. En particular, no parecía haber una manera de aislar y estudiar genes individuales.

Este obstáculo para el progreso de la biología molecular fue superado por el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, que proporcionó a los científicos la posibilidad de aislar, secuenciar y manipular genes individuales derivados de cualquier tipo celular. La aplicación del ADN recombinante ha permitido el estudio molecular detallado de la estructura y función de los genes eucarióticos, revolucionando nuestro entendimiento de la biología celular.

Endonucleasas de restricción

El primer paso en el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante fue la caracterización de las **endonucleasas de restricción** —enzimas que cortan el ADN en lugares concretos y específicos de su secuencia—. Fueron identificadas en bacterias, donde aparentemente cumplen una función defensiva frente a la entrada en la célula de ADN extraño (p. ej., de un virus). Las bacterias poseen una amplia variedad de endonucleasas de restricción que cortan el ADN en más de un centenar de sitios de reconocimiento, cada uno de los cuales consiste en una secuencia específica de entre cuatro y ocho pares de bases (se muestran ejemplos en la **Tabla 4.2**).

Dado que las endonucleasas de restricción digieren el ADN a nivel de secuencias específicas, pueden ser utilizadas para cortar una molécula de ADN en sitios únicos. Por ejemplo, la endonucleasa de restricción *Eco*RI reconoce las secuencias de seis pares de bases GAATTC. Esta secuencia está presente cinco veces en el ADN del bacteriófago λ, por lo que la enzima *Eco*RI digiere el ADN del fago λ en seis fragmentos de entre 3,6 y 21,2 kilobases de longitud (1 kilobase o kb = 1.000 pares de bases) (**Fig. 4.14**). Estos fragmentos pueden separarse según su tamaño por medio de **electroforesis en gel** —un método por el que se separan las moléculas basándose en su velocidad de migración en un campo eléctrico—. El gel, habitualmente compuesto de agarosa o poliacrilamida, se sitúa entre dos compartimentos con electrodos en los que se dispone un tampón o *buffer*. La muestra (p. ej., la mezcla de fragmentos de ADN para ser analizados) se deposita en ranuras preformadas y se aplica el campo eléctrico. Los ácidos nucleicos tienen carga negativa (debido a los residuos fosfato de su estructura), por lo que migran hacia el electrodo positivo. El gel se comporta como un filtro poroso que retrasa la migración de los fragmentos más grandes. Las moléculas de menor tamaño se mueven a través del gel con mayor rapidez, permitiendo la separación de una mezcla de ácidos nucleicos en función de su tamaño.

El orden de los fragmentos de restricción se puede determinar por una serie de métodos, obteniéndose, por ejemplo, un mapa de los sitios de corte de *Eco*RI en el ADN del fago λ. Se pueden utilizar los sitios de corte de varias endonucleasas de restricción para generar **mapas de restricción** detallados de las moléculas de ADN, como los genomas virales **(Fig. 4.15)**. Es posible aislar con electroforesis fragmentos individuales de ADN producidos por la digestión con endonucleasas de restricción para su estudio posterior —incluyendo la determinación de su secuencia de bases—. De esta forma se han caracterizado los ADN de muchos virus.

La digestión con endonucleasas de restricción por sí sola no proporciona suficiente resolución para el análisis de moléculas de ADN mayores, como

◆ **¿Por qué el ADN de las bacterias no es digerido por sus propias endonucleasas de restricción? Las endonucleasas de restricción no funcionan solas en bacterias. Por el contrario, generalmente funcionan en conjunción con enzimas que modifican el ADN bacteriano de modo que ya no es reconocido por las enzimas de restricción. Este sistema de restricción-modificación asegura que sólo el ADN extraño no modificado (p. ej., el ADN vírico) sea digerido por las endonucleasas de restricción expresadas en cualquier especie concreta de bacterias.**

ANIMACIÓN 4.6

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.6

Endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción escinden el ADN en secuencias específicas de ADN, dejando extremos protuberantes o romos en los fragmentos de ADN resultantes.

TABLA 4.2 Secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción representativas

Enzima[a]	Fuente	Secuencia de reconocimiento[b]
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	GGATCC
*Eco*RI	*Escherichia coli* RY13	GAATTC
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	GGCC
*Hin*dIII	*Haemophilus influenzae* Rd	AAGCTT
*Hpa*I	*Haemophilus parainfluenzae*	GTTAAC
*Hpa*II	*Haemophilus parainfluenzae*	CCGG
*Mbo*I	*Moraxella bovis*	GATC
*Not*I	*Nocardia otitidis-caviarum*	GCGGCCGC
*Sfi*I	*Streptomyces fimbriatus*	GGCCNNNNNGGCC
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	TCGA

[a] Las enzimas se nombran según la especie de la que se aislaron, seguido por un número para distinguir distintas enzimas aisladas a partir del mismo organismo (p. ej., *Hpa*I y *Hpa*II).

[b] Las secuencias de reconocimiento muestran únicamente la secuencia de una cadena del ADN de doble cadena. «N» representa cualquier base.

genomas celulares. Una endonucleasa de restricción con una secuencia de reconocimiento de seis pares de bases (como la *Eco*RI) corta el ADN con una frecuencia estadística de un corte cada 4.096 pares de bases ($1/4^6$). Una molécula como el ADN de λ (48,5 kb) se podría esperar que diera unos diez fragmentos *Eco*RI, lo cual es consistente con los resultados ilustrados en la Figura 4.14. Sin embargo, la digestión con endonucleasas de restricción de genomas de mayor tamaño proporciona resultados muy distintos. El genoma humano tiene unas 3×10^6 kb, por lo que daría unos 500.000 fragmentos *Eco*RI. Un número tan grande de fragmentos no se pueden separar entre sí y tras la electroforesis en gel de agarosa del ADN humano digerido con *Eco*RI se obtiene una banda continua en vez de un patrón discreto de fragmentos de ADN. Dado que es imposible aislar fragmentos de restricción individuales, la digestión con endonucleasas de restricción por sí misma no proporciona una fuente de ADN homogéneo apropiado para ser estudiado. Sin embargo, se pueden obtener cantidades suficientes de fragmentos de ADN purificado a través de la clonación molecular.

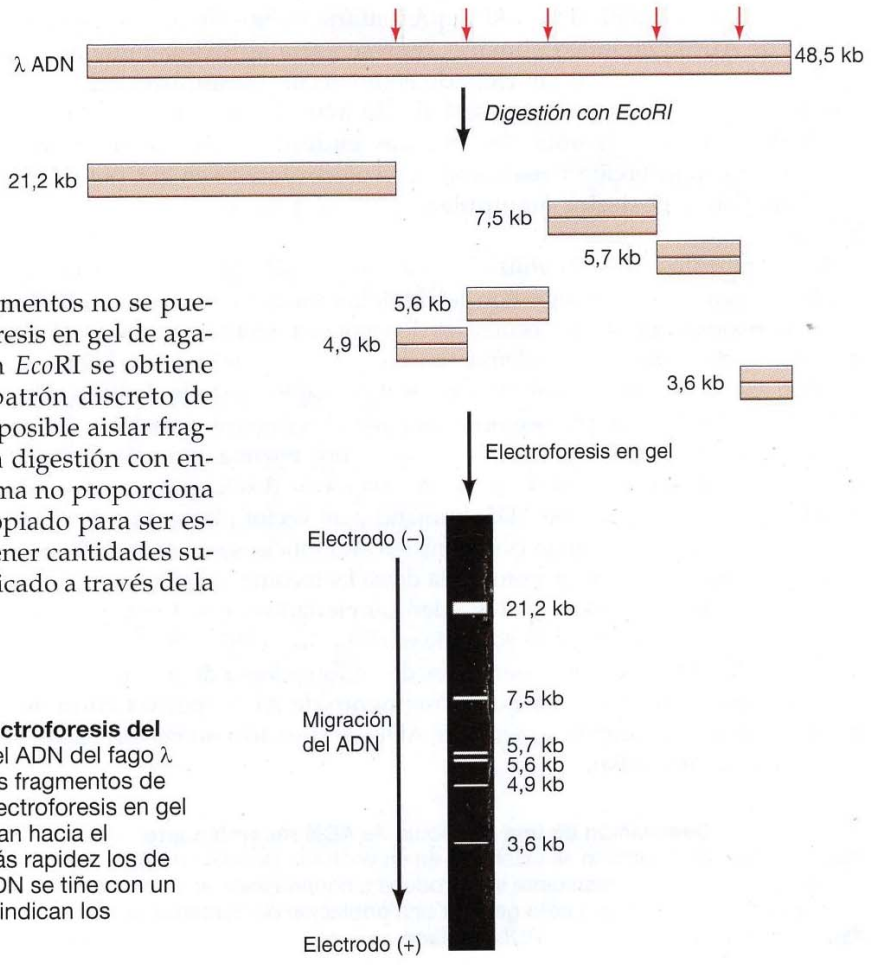


FIGURA 4.14 Digestión con *Eco*Ri y electroforesis del ADN del fago λ. La enzima *Eco*RI corta el ADN del fago λ por cinco sitios (flechas), produciendo seis fragmentos de ADN. Estos fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN migran hacia el electrodo positivo, desplazándose con más rapidez los de menor tamaño. Tras la electroforesis el ADN se tiñe con un pigmento fluorescente y se fotografía. Se indican los tamaños de los fragmentos de ADN.

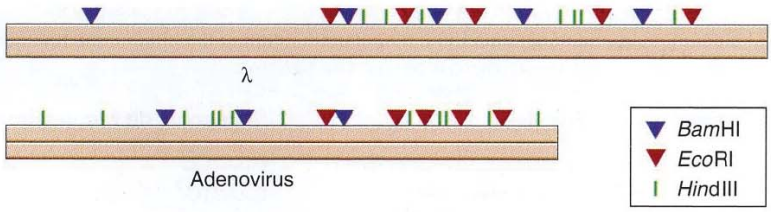


FIGURA 4.15 Mapas de restricción del ADN de λ y del ADN del adenovirus humano 2. La localización de los sitios de corte de *Bam*HI, *Eco*RI y *Hind*III se muestran en los ADN del bacteriófago λ de *E. coli* (48,5 kb) y del adenovirus humano 2 (35,9 kb).

Generación de moléculas de ADN recombinante

ANIMACIÓN 4.7

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.7

Moléculas de ADN recombinante. Se clona un fragmento de ADN mediante inserción en una molécula (vector) que se replica en una célula huésped.

La estrategia básica en la **clonación molecular** es insertar un fragmento de ADN de interés (p. ej., un segmento de ADN humano) en una molécula (llamada **vector**) que es capaz de replicarse de forma independiente en una célula huésped. El resultado es una **molécula recombinante** o **clon molecular**, compuesto de las secuencias del ADN insertado y del vector. Se pueden obtener grandes cantidades del ADN insertado si se permite replicarse a la molécula recombinante en un huésped apropiado. Por ejemplo, se pueden clonar fragmentos de ADN humano en vectores plasmídicos (**Fig. 4.16**). Los **plásmidos** son pequeñas moléculas circulares de ADN que pueden replicarse independientemente —sin estar asociados con el ADN cromosómico— en bacterias. Los plásmidos recombinantes que portan insertos de ADN humano pueden ser introducidos en *E. coli*, donde replican junto con las bacterias para dar lugar a millones de copias del ADN plasmídico. El ADN de estos plásmidos puede aislarse, obteniéndose grandes cantidades de moléculas recombinantes que contienen un fragmento único de ADN humano. Mientras que un fragmento típico de ADN de una longitud de 1 kb representaría menos de una parte en un millón de ADN genómico humano, representaría aproximadamente una parte en cinco después de ser clonado en un vector plasmídico. Adicionalmente el fragmento puede ser aislado de manera sencilla del resto del ADN del vector utilizando las mismas endonucleasas de restricción usadas para su inserción y realizando una electroforesis en gel, permitiendo el análisis y posterior manipulación de un fragmento puro de ADN humano.

Los fragmentos de ADN utilizados para crear moléculas de ADN recombinante son generados por digestión con endonucleasas de restricción. Muchas de estas enzimas cortan sus secuencias de reconocimiento de forma escalonada, generando extremos complementarios o cohesivos de una sola hebra que pueden asociarse entre sí por apareamiento complementario de bases (**Fig. 4.17**). Los extremos complementarios emparejados pueden conectarse de forma definitiva por medio de una **ADN ligasa**, una enzima que repara roturas en las hebras de ADN (véase Cap. 7). De esta forma dos fragmentos distintos de ADN (p. ej., un inserto de ADN humano y un vector plasmídico de ADN) acondicionados tras digestión por la misma endonucleasa de restricción pueden ser unidos para crear una molécula de ADN recombinante.

Los fragmentos de ADN que pueden ser clonados no se limitan a aquellos que terminan en sitios de corte de enzimas de restricción. Enlazadores sintéticos de ADN que contienen sitios de endonucleasa de restricción pueden añadirse al final de cualquier fragmento de ADN, permitiendo que prácticamente cualquier fragmento de ADN sea ligado a un vector y aislado como un clon molecular.

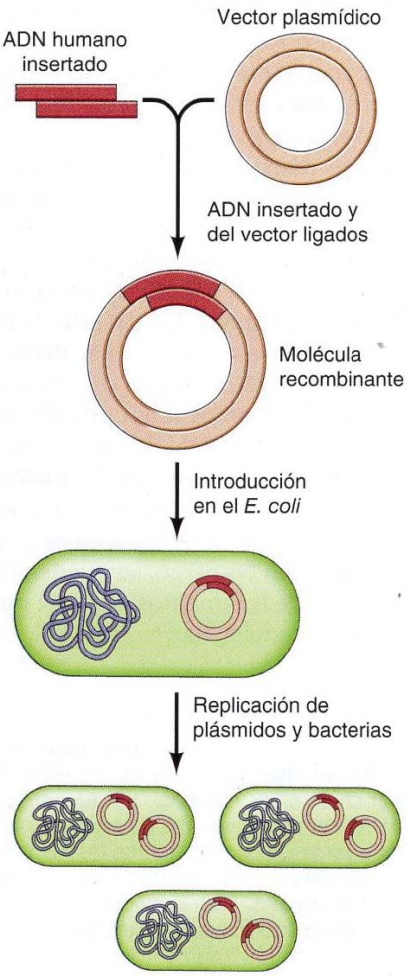


FIGURA 4.16 Generación de una molécula de ADN recombinante. Un fragmento de ADN humano es insertado en un vector plasmídico de ADN. La molécula recombinante resultante se introduce a continuación en *E. coli*, donde se replica junto con la bacteria para generar una población de bacterias portadoras de plásmidos con el inserto de ADN humano.

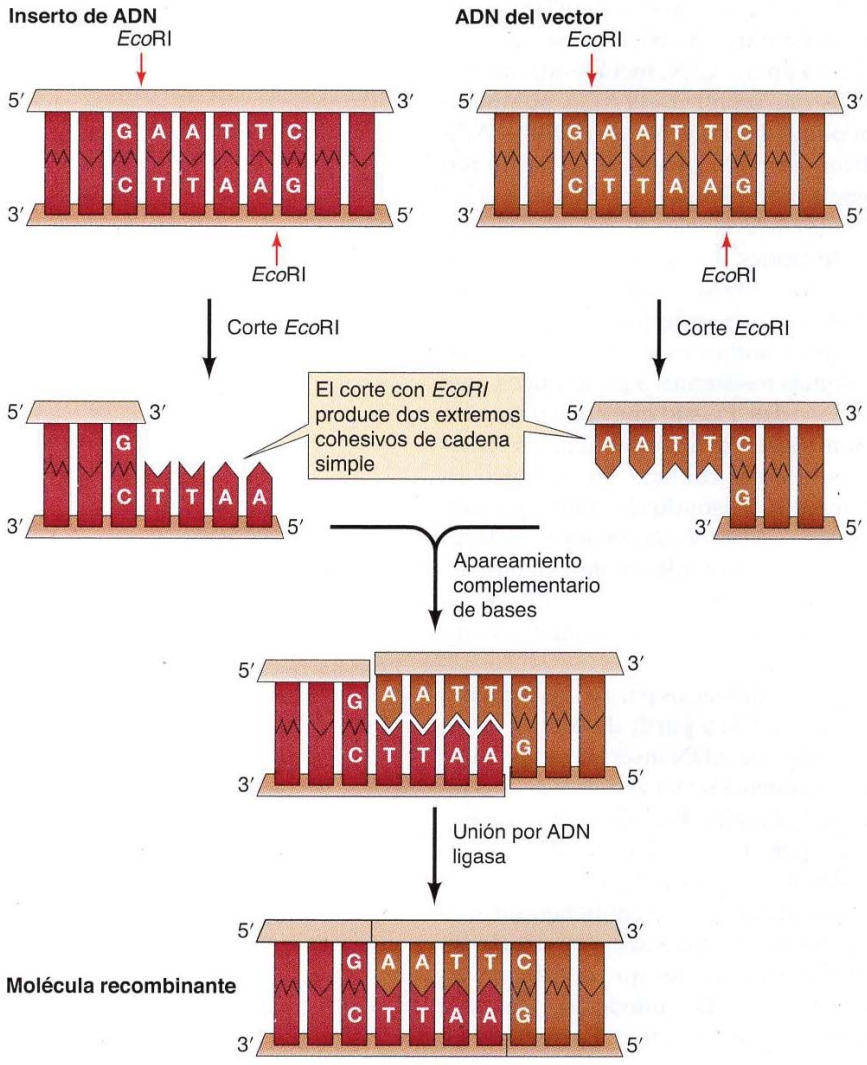


FIGURA 4.17 Unión de moléculas de ADN. El ADN del vector y el pasajero se digieren con una endonucleasa de restricción (como la *Eco*RI), que corta en sitios escalonados dejando extremos complementarios de cadena simple. El ADN del vector y el que se desea insertar se asocian por apareamiento complementario de bases, y la unión covalente de las hebras de ADN por medio de una ADN ligasa produce una molécula recombinante.

Además del ADN, es posible clonar también secuencias de ARN (**Fig. 4.18**). El primer paso es sintetizar una copia de ADN a partir del ARN por medio de la transcriptasa inversa. El ADN producido (denominado **ADNc** porque es complementario al ARN utilizado como molde) se liga al vector de ADN del modo antes descrito. Dado que los genes eucarióticos están habitualmente interrumpidos por secuencias no codificantes o intrones (véase Cap. 6), que se eliminan del ARNm por corte y empalmado o *splicing*, la posibilidad de clonar ADNc además del ADN genómico ha sido crítica para el entendimiento de la estructura y función de los genes. Además, la clonación del ADNc permite que el ARNm correspondiente a un solo gen sea aislado como un gen molecular.

Vectores para ADN recombinante

Dependiendo del tamaño del ADN que se inserta y del propósito del experimento es posible utilizar distintos vectores de clonación para generar moléculas recombinantes. Los sistemas más básicos para el aislamiento y propagación de ADN clonado se exponen aquí. Otros tipos de vectores desarrollados para expresar ADN clonado e introducir moléculas recombinantes en células eucarióticas se discuten en secciones posteriores.

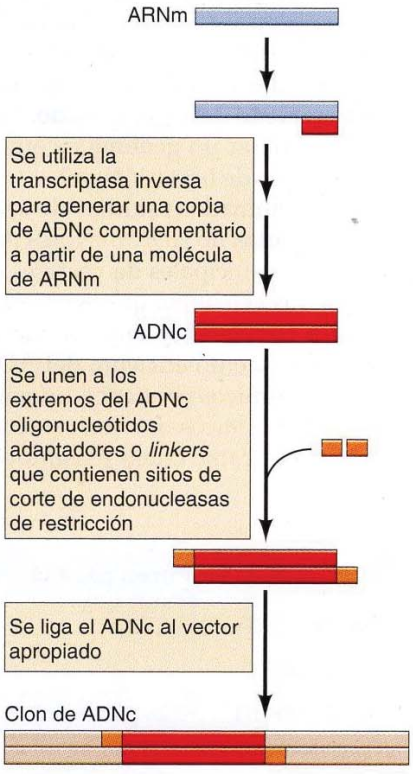


FIGURA 4.18 Clonación de ADN complementario.

Los plásmidos generalmente se usan para clonar insertos de ADN genómico o ADNc de hasta unos pocos miles de pares de bases. Los vectores plasmídicos generalmente consisten en 2 a 4 kb de ADN, incluyendo un **origen de replicación** —la secuencia de ADN que señaliza a la ADN polimerasa de la célula hospedadora para que replique la molécula de ADN—. Adicionalmente, los vectores plasmídicos portan genes que confieren resistencia a antibióticos (p. ej., resistencia a ampicilina), de forma que las bacterias que portan el plásmido puedan ser seleccionadas. Por ejemplo, en la **Figura 4.19** se ilustra el aislamiento de clones de ADNc humano en un vector plasmídico. Un grupo de fragmentos de ADNc son ligados a un plásmido de ADN previamente digerido mediante una endonucleasa de restricción. Las moléculas de ADN recombinantes resultantes se emplean a continuación para transformar *E. coli*. Las colonias resistentes a antibióticos, que contienen el ADN plasmídico, son seleccionadas. Puesto que cada plásmido recombinante da lugar a una sola colonia resistente a antibiótico, las bacterias presentes en una cualquiera de estas colonias contendrán un único inserto de ADNc. Las bacterias que contengan el plásmido de interés pueden crecerse en grandes cantidades y extraerse su ADN. Las pequeñas moléculas circulares de ADN plasmídico, de las que a menudo existen cientos de copias por célula, pueden separarse del ADN cromosómico bacteriano; el resultado es ADN plasmídico purificado apropiado para el análisis del inserto clonado.

Los vectores de bacteriófago λ también son empleados para el aislamiento tanto de ADN genómico como de clones de ADNc a partir de células eucariotas, y puede acomodar fragmentos mayores de ADN inserto que los plásmidos. En los vectores de clonación λ, las secuencias del genoma del bacteriófago que son dispensables para la replicación viral han sido eliminadas y sustituidas por sitios únicos de restricción para la inserción de ADN clonado. Estas moléculas recombinantes pueden ser introducidas en *E. coli*, donde se replican y generan millones de fagos progenie que contienen un solo inserto de ADN. El ADN de estos fagos puede entonces aislarse, dando lugar a grandes cantidades de moléculas recombinantes que contienen un solo fragmento de ADN clonado. Los insertos de ADN pueden ser de hasta 15 kb y generar un genoma recombinante que puede ser empaquetado en las partículas de bacteriófago λ.

En determinados estudios de análisis de ADN genómico es preciso clonar fragmentos de ADN mayores de lo que un fago λ puede portar. Existen cinco tipos principales de vectores empleados con este fin (**Tabla 4.3**). Vectores de tipo **cósmico** que acomodan insertos de aproximadamente 30-45 kb. Estos vectores contienen secuencias del bacteriófago λ que permiten el empaquetamiento eficiente del ADN clonado en partículas de fago. Además, los cósmicos contienen orígenes de replicación y genes para la resistencia a antibióticos que son característicos de los plásmidos, de modo que pueden replicarse como plásmidos en el interior de células bacterianas.

TABLA 4.3 Vectores para clonar fragmentos grandes de ADN

Vector	Inserto de ADN (kb)	Célula huésped
Cósmidos	30-45	*E. coli*
Bacteriófago P1	70-100	*E. coli*
Cromosoma artificial P1 (PAC)	130-150	*E. coli*
Cromosoma artificial bacteriano (BAC)	120-300	*E. coli*
Cromosoma artificial de levadura (YAC)	250-400	Levadura

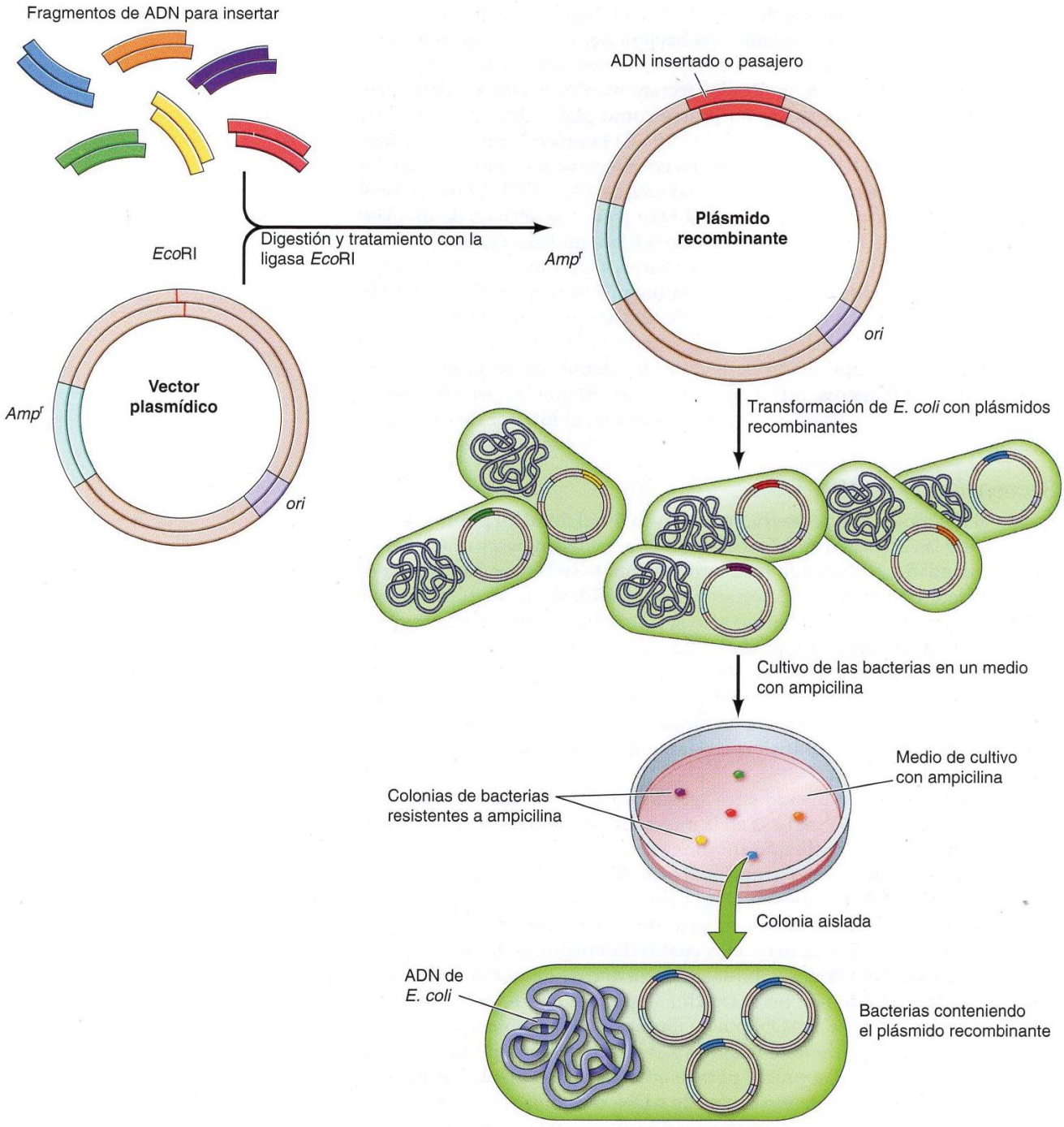


FIGURA 4.19 Clonación con vectores plasmídicos. El vector es una pequeña molécula circular que contiene un origen de replicación (*ori*), un gen que confiere resistencia a ampicilina (*Amp*^{r}) y un sitio de restricción (p. ej., *Eco*RI) que puede utilizarse para insertar ADN extraño. El ADN pasajero (p. ej., ADNc humano) se liga al vector y los plásmidos recombinantes son usados para transformar *E. coli.* Las bacterias se cultivan en un medio que contiene ampicilina, por lo que únicamente forman colonias las bacterias que contienen el plásmido y son resistentes a ampicilina. Cada colonia de bacterias conteniendo el plásmido puede entonces aislarse y hacerse crecer en grandes cantidades, para aislar los plásmidos recombinantes.

Otros dos tipos de vectores se derivan del bacteriófago P1, en lugar del bacteriófago λ. Los vectores derivados del bacteriófago P1, que permiten acomodar fragmentos de ADN de 70 a 100 kb, contienen secuencias que permiten el empaquetamiento de moléculas recombinantes *in vitro* en partículas de fago P1 para a continuación replicarse como plásmidos en *E. coli*. Los vectores de tipo **cromosoma artificial P1 (PAC)** también contienen secuencias del bacteriófago P1, pero se introducen directamente como plásmidos en *E. coli* y pueden acomodar insertos mayores de 130 a 150 kb. Los vectores de tipo **cromosoma artificial de bacteriófago (BAC)** se derivan de un plásmido que ocurre de forma natural en *E. coli* (denominado factor F). El origen de replicación y otras secuencias del factor F permite a los BAC replicarse como plásmidos estables que contienen insertos de 120 a 300 kb. Fragmentos incluso mayores de ADN (250-400 kb) pueden clonarse en vectores de tipo **cromosoma artificial de levadura (YAC)**. Estos vectores contienen orígenes de replicación de levaduras además de otras secuencias (centrómeros y telómeros, estudiados en el Cap. 6) que les permiten replicarse como moléculas lineales tipo cromosoma en el interior de células de levadura.

Secuenciación de ADN

La clonación molecular de un fragmento individual de ADN permite el aislamiento de las grandes cantidades de material genético necesarias para su estudio detallado, incluyendo la determinación de su secuencia de nucleótidos. La determinación de las secuencias nucleotídicas de un gran número de genes ha permitido estudiar no sólo la estructura de sus productos proteínicos, sino también las propiedades de las secuencias de ADN que regulan la expresión génica. Además, las secuencias codificantes de genes de reciente descubrimiento están relacionadas frecuentemente con las de genes previamente estudiados, y la función de los genes aislados *de novo* se puede con frecuencia deducir correctamente basándose en dichas similitudes.

El método básico empleado para secuenciar el ADN, desarrollado por Frederick Sanger en 1977, se basa en la interrupción prematura de la síntesis de ADN mediante la inclusión de **dideoxinucleótidos** finalizadores de cadena (que no contienen el grupo hidroxilo 3′ de la desoxirribosa) en las reacciones de la ADN-polimerasa (**Fig. 4.20**). La síntesis de ADN se inicia en un punto único del ADN clonado a partir de un cebador sintético. La reacción de síntesis de ADN incluye a los cuatro dideoxinucleótidos (A, C, G y T) además de sus homólogos habituales. Cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos está marcado con un marcador fluorescente diferente, de modo que su incorporación en el ADN puede monitorizarse. La incorporación de un dideoxinucleótido detiene la síntesis de ADN porque no hay ningún grupo hidroxilo en 3′ disponible para la adición del siguiente nucleótido. Así se generan una serie de moléculas de ADN, cada una terminando en la base representada por un dideoxinucleótido fluorescente específico. Estos fragmentos de ADN son entonces separados en función de su tamaño mediante electroforesis en gel. A medida que se resuelven las bandas de ADN recién sintetizadas a través del gel, pasan a través de un haz de láser que excita los marcadores fluorescentes. La luz emitida resultante es detectada por un fotomultiplicador, y un ordenador recolecta y analiza los datos. El tamaño de cada fragmento se determina por su dideoxinucleótido terminal, marcado por un color específico de fluorescencia, de modo que la secuencia de ADN puede ser leída por el orden de fragmentos marcados con fluorescencia a medida que migran a través del gel.

La secuenciación de ADN automática de alto rendimiento, que emplea dideoxinucleótidos, ha permitido el análisis a gran escala necesario para de-

ANIMACIÓN 4.8

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.8

Secuenciación de una hebra de ADN. Un método para la secuenciación de ADN implica a una reacción de síntesis de ADN modificada que emplea nucleótidos de terminación de cadena y cebadores fluorescentes, que pueden ser identificados mediante sistemas de detección automatizados.

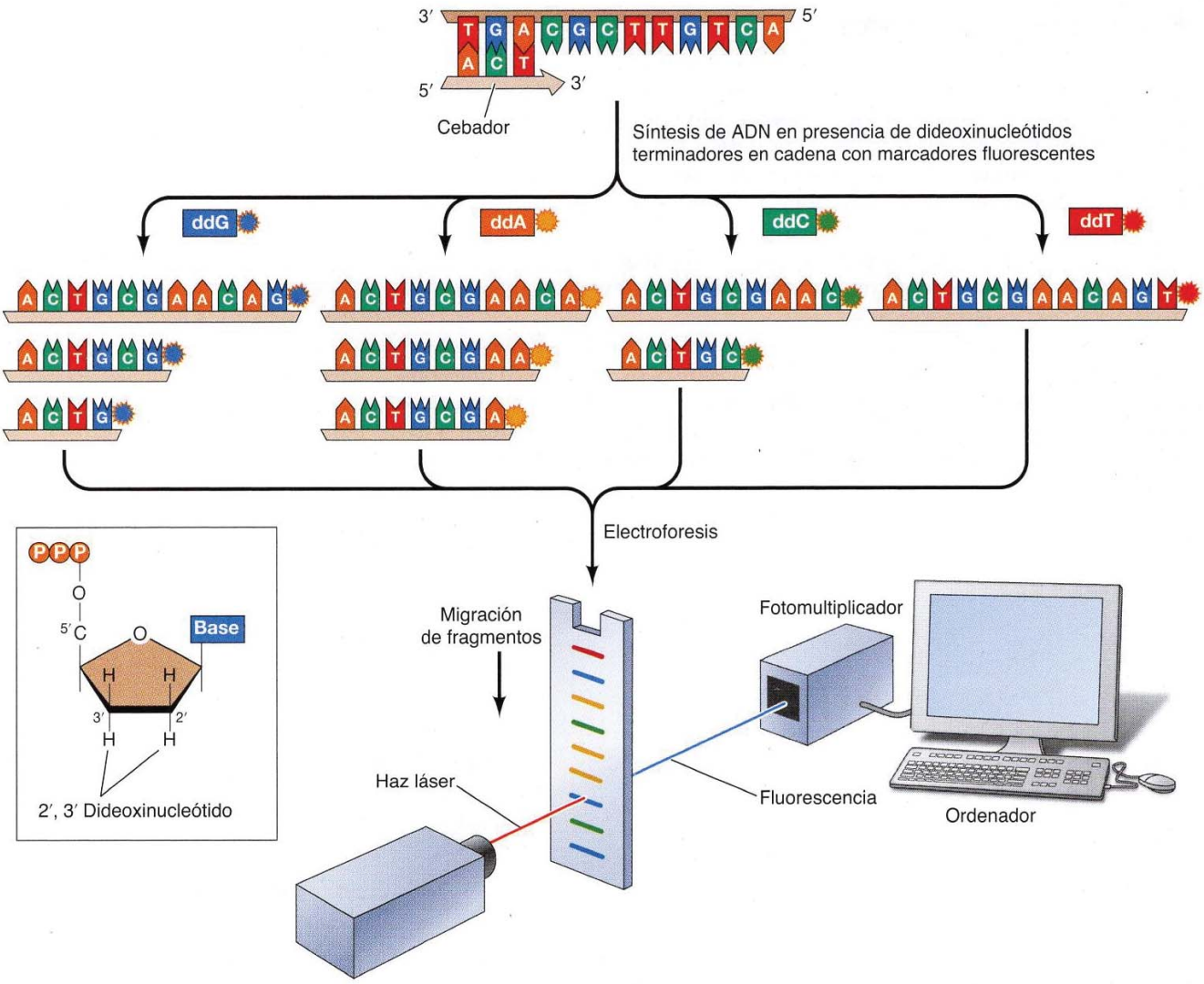


FIGURA 4.20 Secuenciación de ADN. Dideoxinucleótidos, que carecen de grupos OH en las posiciones 3′ además de la posición 2′ de la desoxirribosa, se emplean para terminar la síntesis de ADN en bases específicas. Estas moléculas son incorporadas de forma normal en las cadenas crecientes de ADN. Puesto que carecen de un OH 3′, sin embargo, el siguiente nucleótido no puede añadirse, de forma que la síntesis de la hebra de ADN termina. La síntesis de ADN es iniciada en un sitio específico con un cebador. La reacción contiene cuatro dideoxinucleótidos. Cuando se incorpora el dideoxinucleótido, la síntesis de ADN se detiene, de forma que la reacción genera una serie de productos que se extienden desde el cebador hasta la base sustituida por un dideoxinucleótido fluorescente. Estos productos son separados mediante electroforesis en gel. A medida que las hebras de ADN migran a través del gel, pasan a través de un haz láser que excita a los marcadores fluorescentes de los dideoxinucleótidos. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador que está conectado a un ordenador que recolecta y analiza los datos que determinan la secuencia de ADN.

terminar las secuencias de genomas completos, incluido el humano. No obstante, en los últimos años se han desarrollado métodos nuevos que permiten secuenciar el ADN mucho más rápido y con menor coste. Como se dice en el Capítulo 5, estas técnicas novedosas, agrupadas bajo el nombre de **secuenciación de la siguiente generación**, han permitido determinar fácilmente la secuenciación de muchos genomas individuales.

Expresión de genes clonados

Además de permitir la determinación de la secuencia de nucleótidos de los genes —y por tanto la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas— la clonación molecular ha proporcionado nuevas posibilidades en la obtención de grandes cantidades de proteínas para su caracterización estructural y funcional. Muchas proteínas de interés están presentes a muy baja concentración en células eucarióticas y, por tanto, no pueden purificarse en cantidades significativas por técnicas bioquímicas convencionales. Sin embargo, una vez clonado su gen este problema puede ser solucionado con el desarrollo de vectores que consigan altos niveles de expresión genética en bacterias o células eucarióticas.

Para expresar un gen eucariótico en *E. coli* el ADNc de interés se clona con un fago o un plásmido (denominados **vectores de expresión**) que contenga las secuencias que dirigen la transcripción y traducción del gen insertado en bacterias (**Fig. 4.21**). Los genes insertados se llegan a expresar a niveles tales que la proteína codificada por el gen clonado supone el 10% del

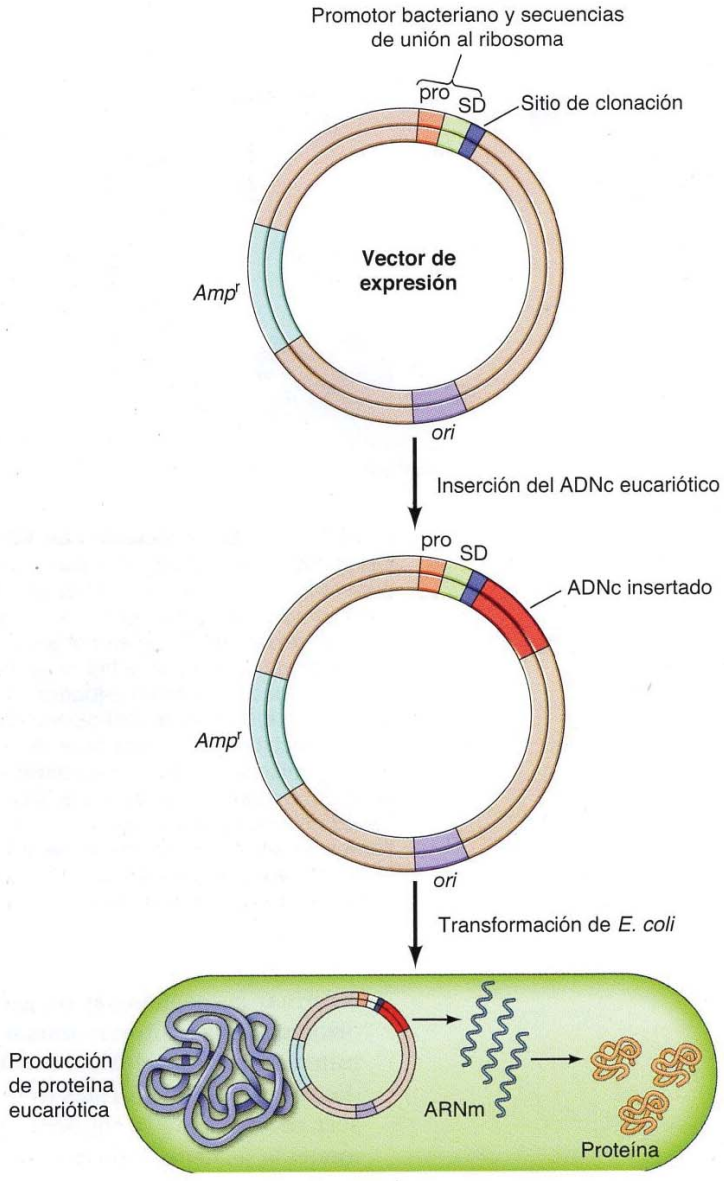


FIGURA 4.21 Expresión en bacterias de genes clonados. Los vectores de expresión contienen las secuencias promotoras (pro) que dirigen la transcripción del ADN insertado en bacterias y las secuencias necesarias para la unión del ARNm a los ribosomas (secuencias Shine-Dalgarno [SD], como se comenta en el Cap. 9). Es posible expresar en *E. coli* de forma eficiente un ADNc eucariótico insertado junto a estas secuencias, obteniéndose proteínas eucarióticas a partir de bacterias transformadas.

total de la producción de proteína bacteriana. La purificación posterior de cantidades suficientes de la proteína para estudios bioquímicos o estructurales es una tarea sencilla.

En ocasiones es más útil expresar un gen clonado en una célula eucariótica en lugar de hacerlo en una bacteria. Este modo de expresión es importante, por ejemplo, para asegurarse de que las modificaciones postraduccionales de la proteína (como la adición de carbohidratos o lípidos) se producen de forma normal. La expresión de proteínas en células eucarióticas puede lograrse, como en *E. coli* y se consigue insertando el gen clonado en un vector (habitualmente derivado de un virus) que induce una expresión génica de alto nivel.

Detección de ácidos nucleicos y proteínas

El advenimiento de la clonación molecular ha permitido el aislamiento y caracterización de genes individuales procedentes de células eucariotas. La comprensión del papel de los genes en el interior celular, sin embargo, requiere del análisis de la organización intracelular y de la expresión de los genes individuales y de las proteínas que codifican. En esta sección, los procedimientos básicos empleados para la detección de ácidos nucleicos y proteínas específicos son analizados. Estas técnicas son importantes para una amplia variedad de estudios, incluyendo el análisis de la expresión génica, la localización de proteínas en orgánulos subcelulares.

◆ La PCR se ha convertido en un método forense extremadamente potente. La amplificación por PCR permite a los investigadores obtener un perfil de ADN a partir de muestras pequeñas de ADN presentes en una escena de crimen.

Amplificación de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa

La clonación molecular permite producir y aislar grandes cantidades de un ADN en particular. La **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR**), desarrollada por Kary Mullis en 1988, es un método alternativo para conseguir un gran número de fragmentos de material genético a partir de una única copia de ADN. Siempre que se conozca parte de la secuencia de la molécula de ADN, la PCR puede conseguir una gran amplificación del ADN por medio de reacciones llevadas a cabo completamente *in vitro*. La ADN polimerasa se emplea para replicar repetidamente un segmento determinado de ADN. El número de secuencias de ADN se va incrementando de modo exponencial, doblándose con cada ciclo de replicación, por lo que se puede obtener una cantidad sustancial de copias a partir de un pequeño número de moldes de ADN iniciales. Por ejemplo, una única molécula de ADN sometida a 30 ciclos de amplificación da lugar a 2^{30} copias (aproximadamente mil millones). Por tanto, se pueden amplificar moléculas únicas de ADN para producir cantidades fácilmente detectables de ADN, que pueden aislarse por clonación molecular o ser analizadas directamente por secuenciación de nucleótidos.

El proceso de amplificación de ADN por PCR se muestra en la **Figura 4.22.** El material de partida puede ser bien un fragmento de ADN clonado o una mezcla de moléculas de ADN —por ejemplo, todo el ADN de células humanas—. A partir de esta mezcla es posible amplificar una región específica de ADN, siempre que conozcamos la secuencia de nucleótidos que rodea dicha región para poder diseñar cebadores o *primers* que comiencen la síntesis de ADN en el punto deseado. Los cebadores son habitualmente oligonucleótidos sintetizados químicamente compuestos de 15 a 20 bases de ADN. Dos iniciadores comienzan la síntesis de ADN en direcciones opuestas desde hebras opuestas. La reacción empieza calentando el ADN diana a altas temperaturas (p. ej., 95 °C) lo cual separa las hebras. Se desciende la temperatura para que los cebadores se emparejen con sus secuencias complementarias en las hebras del ADN. La ADN polimerasa utiliza los cebadores para sintetizar una nueva hebra complementaria sobre cada hebra de ADN preexistente. En un ciclo de amplificación se obtienen dos moléculas de ADN nuevas a partir

ANIMACIÓN 4.9

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.9

Reacción en cadena de la polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa permite la producción de millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula de ADN al inicio.

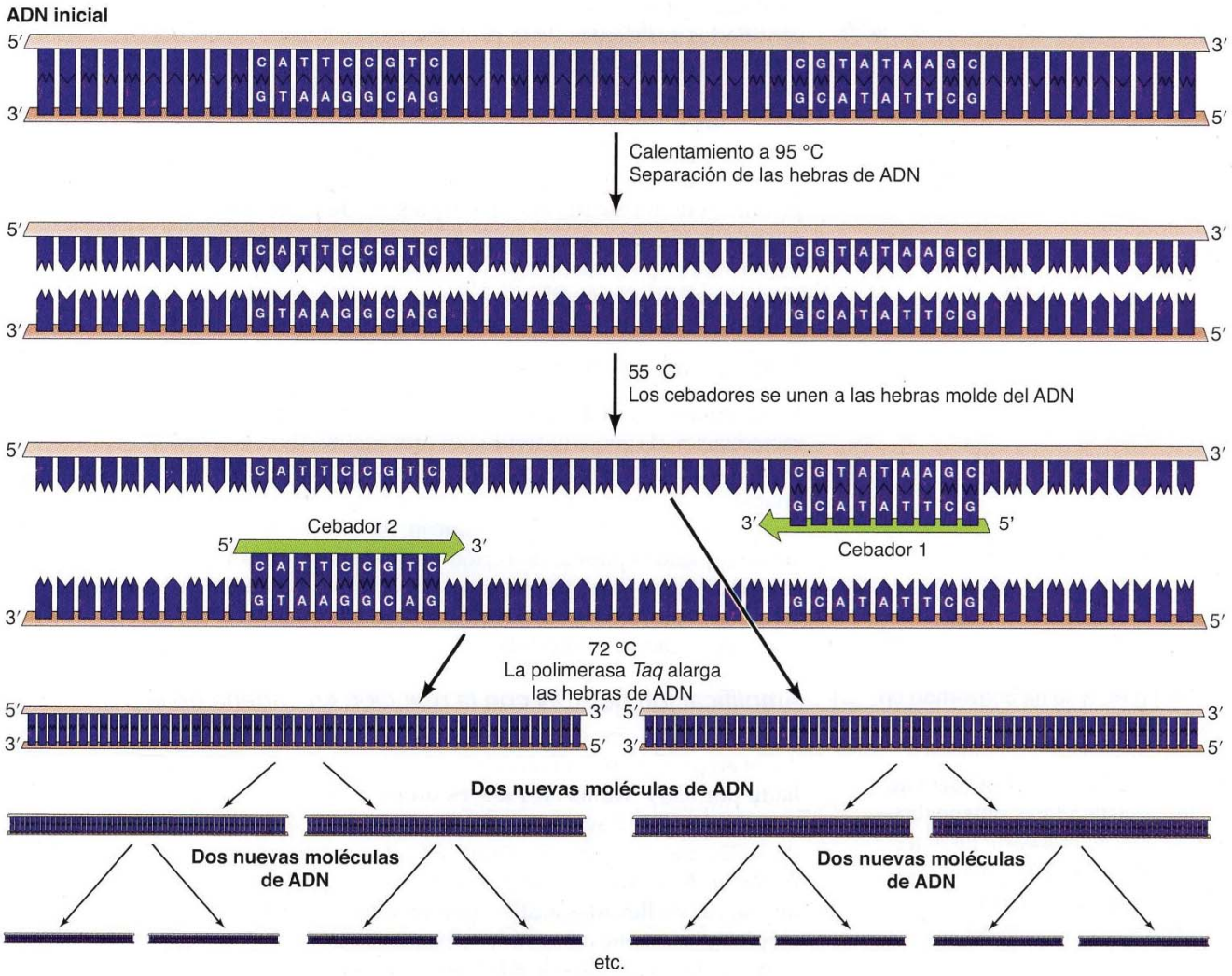


FIGURA 4.22 Amplificación del ADN por PCR. La región de ADN que se desea amplificar está flanqueada por dos secuencias utilizadas para cebar la síntesis de ADN. El ADN de doble cadena inicial se calienta para separar las hebras y después se enfría para permitir que los cebadores (habitualmente oligonucleótidos de entre 15 y 20 bases) se unan a cada hebra de ADN. La ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (polimerasa *Taq*) se usa para sintetizar nuevas hebras de ADN empezando en los cebadores, produciéndose la formación de dos nuevas moléculas de ADN. El proceso se puede repetir múltiples veces, consiguiéndose en cada ciclo una amplificación del doble de ADN.

de la original. El proceso se puede repetir múltiples veces, doblándose el número de moléculas de ADN en cada ciclo de amplificación.

Los múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento se llevan a cabo por medio de sistemas térmicos programables denominados termocicladores. Las ADN polimerasas empleadas son enzimas termoestables de bacterias como *Thermus aquaticus*, que viven en manantiales calientes a temperaturas de unos 75 °C. Estas polimerasas son estables incluso a las altas temperaturas empleadas para separar las hebras del ADN de doble hebra, por lo que la amplificación de ADN se puede realizar de modo rápido y automático. Es posible amplificar secuencias de ARN por este método, sintetizando una copia de ADNc por medio de la transcriptasa inversa previamente a la amplificación por PCR.

ANIMACIÓN 4.10

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.10

Hibridación de ácidos nucleicos. A temperaturas elevadas, las hebras complementarias de ADN se separan, y cuando se enfrían vuelven a formar moléculas de doble hebra como dicta la complementariedad de bases.

ANIMACIÓN 4.11

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.11

Southern blot. Los fragmentos de ADN son separados empleando la electroforesis en gel y después —como parte de la técnica del Southern blot— se incuban con una sonda de ADN radiactiva para identificar los fragmentos de ADN específicos.

Si se conoce suficientemente una secuencia de un gen de modo que puedan especificarse cebadores, la amplificación por PCR proporciona un método muy poderoso de detección de pequeñas cantidades de moléculas específicas de ADN o de ARN en una mezcla compleja de otras moléculas. Las únicas moléculas de ADN que serán amplificadas por PCR son aquellas que contengan secuencias complementarias a los cebadores empleados en la reacción. Por lo tanto, la PCR puede amplificar selectivamente un molde específico a partir de mezclas complejas, como el ADN o ARN total de una célula.

Es importante observar que la PCR puede utilizarse también de forma cuantitativa para determinar las cantidades de moléculas de ADN o ARN concretas en una muestra. Estos métodos se basan en la medida de la formación de productos de ADN de doble hebra durante la amplificación por PCR. En la reacción de PCR se utiliza un colorante fluorescente que se une al ADN de doble hebra y sólo experimenta fluorescencia cuando se liga al mismo. Después, se controla la fluorescencia tras cada ciclo de PCR, y la intensidad de dicha fluorescencia es indicativa de la cantidad de ADN que ha sido amplificado. Dado que la cantidad de ADN amplificado después de un número dado de ciclos se determina por la cantidad de molde que estaba presente inicialmente, se obtiene así una cuantificación de la cantidad de ADN o ARN diana que estaba presente en la muestra. Como la fluorescencia se mide de forma continua durante la reacción de PCR, este método recibe el nombre de **PCR en tiempo real**. Su extraordinaria sensibilidad lo ha hecho importante para diversas aplicaciones, entre ellas el análisis de la expresión génica en células y tejidos.

Hibridación de ácidos nucleicos

La clave para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos es el apareamiento de bases entre hebras complementarias de ARN o ADN. Sometidas a altas temperaturas (p. ej., 90 a 100 °C) las hebras complementarias de ADN se separan (desnaturalización) dando moléculas de cadena simple. Si dichas hebras desnaturalizadas de ADN se incuban en condiciones adecuadas (65 °C), renaturalizarán para formar moléculas de doble cadena por apareamiento complementario de bases —un proceso denominado **hibridación de ácidos nucleicos**—. Pueden hibridar entre sí dos hebras de ADN, dos hebras de ARN y una de ADN con otra de ARN.

Como se ha descrito anteriormente, la hibridación entre cebadores y ADN molde proporciona la especificidad a la amplificación por PCR. Adicionalmente, una variedad de otras técnicas emplean la hibridación de ácidos nucleicos como medio para detectar secuencias de ADN o ARN que son complementarias a cualquier ácido nucleico aislado, como una secuencia de ADN clonado (**Fig. 4.23**). El ADN clonado es marcado con nucleótidos radioactivos o con nucleótidos modificados que pueden detectarse por fluorescencia o quimioluminiscencia. Este ADN marcado es después empleado como sonda para identificar la hibridación con secuencias de ADN o ARN complementario, que son detectadas mediante radioactividad, fluorescencia o luminiscencia de los híbridos de doble cadena resultantes.

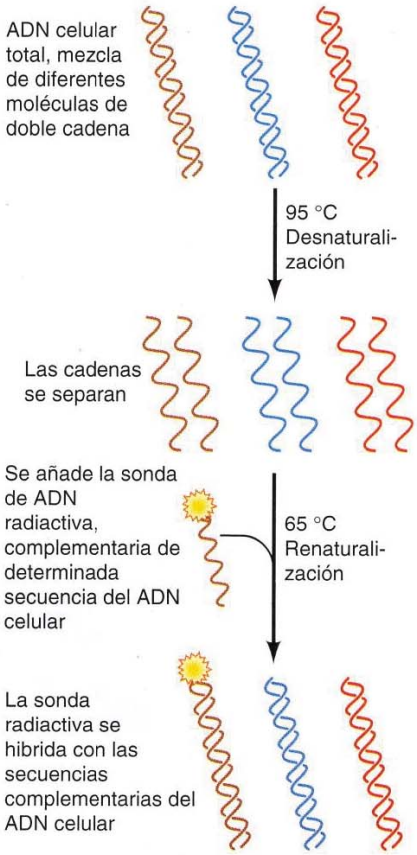


FIGURA 4.23 Detección de ADN por hibridación de ácidos nucleicos. Puede detectarse una secuencia específica entre todo el ADN celular por hibridación con una sonda de ADN marcada radiactivamente. Se desnaturaliza el ADN calentándolo hasta 95 °C, obteniéndose moléculas de cadena única. Se añade la sonda marcada radiactivamente y se baja la temperatura hasta los 65 °C, permitiendo que las cadenas de ADN complementarias se apareen entre sí. La sonda marcada se hibrida con las secuencias complementarias del ADN celular, que pueden ser detectadas entonces como moléculas radiactivas de doble cadena.

La **transferencia Southern** o *Southern blotting* (técnica desarrollada por E. M. Southern) se utiliza de modo generalizado para la detección de genes específicos en el ADN celular (**Fig. 4.24**). El ADN problema es digerido por una endonucleasa de restricción, y los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis. El gel se adhiere a un filtro de nitrocelulosa o nailon, al cual se transfieren los fragmentos de ADN, para dar una réplica del gel. El filtro es entonces incubado con una sonda marcada, que hibrida con los fragmentos de ADN que contienen la secuencia complementaria, permitiendo la visualización de estos fragmentos específicos de ADN celular.

La **transferencia Northern** o *Northern blotting* es una variante de la técnica de transferencia de Southern, utilizada para la detección de ARN en vez de ADN. La totalidad del ARN celular es extraída y fraccionada según su tamaño por electroforesis en gel. De igual forma que en la transferencia de Southern, los ARN se transfieren a un filtro y se detectan por hibridación con una sonda clonada. La transferencia de Northern se usa con frecuencia en estudios sobre expresión génica —por ejemplo para determinar la presencia de ARNm específicos en distintos tipos celulares.

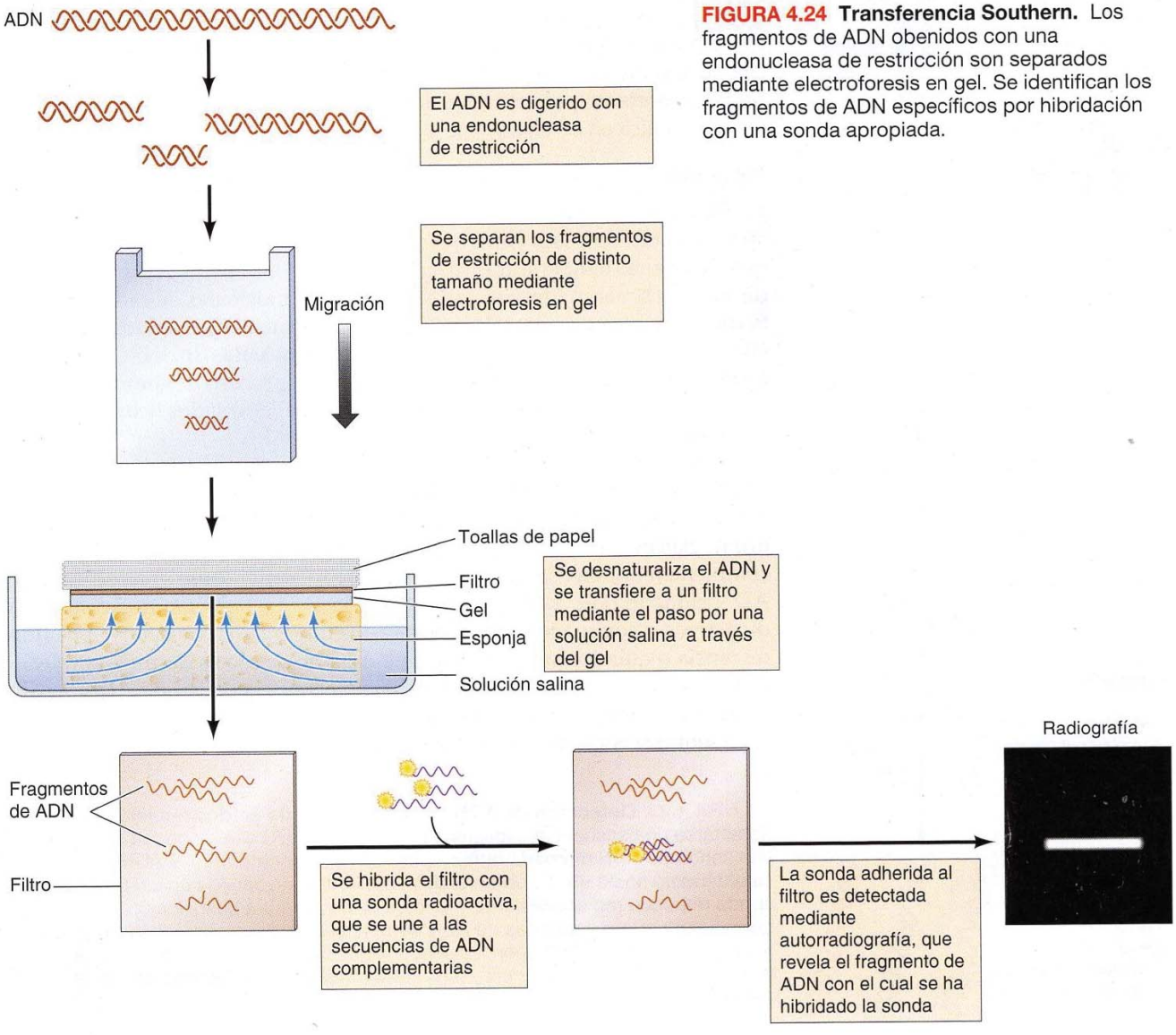


FIGURA 4.24 Transferencia Southern. Los fragmentos de ADN obenidos con una endonucleasa de restricción son separados mediante electroforesis en gel. Se identifican los fragmentos de ADN específicos por hibridación con una sonda apropiada.

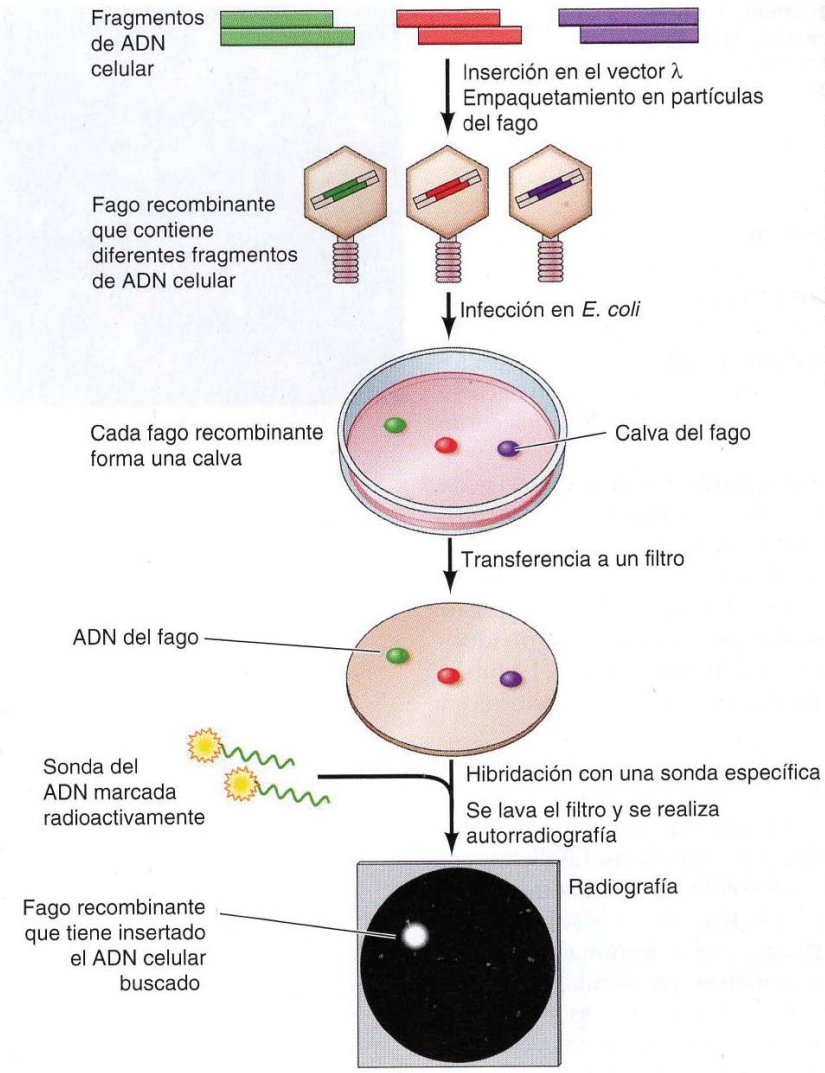


FIGURA 4.25 Búsqueda por hibridación en una biblioteca recombinante. Los fragmentos de ADN celular son clonados en un vector bacteriófago λ y son empaquetados en partículas del fago, obteniéndose una serie de fagos recombinantes que contienen diferentes ADN celulares insertados. Los fagos infectan bacterias, y el cultivo se cubre con un filtro. Algunos de los fagos de cada calva se transfieren al filtro, que entonces se hibrida con una sonda marcada radioactivamente para identificar la placa de fagos que contiene el gen buscado. En ese momento se puede aislar la calva de fagos dentro del cultivo original.

La hibridación de ácidos nucleicos también puede emplearse para identificar clones moleculares que contienen insertos específicos de ADN celular. El primer paso en el aislamiento tanto de ADN genómico o de clones de ADNc es frecuentemente la preparación de **bibliotecas de ADN recombinante** —colecciones de clones que contienen todas las secuencias genómicas o de ARNm de un tipo celular concreto (**Fig. 4.25**)—. Por ejemplo, una biblioteca de ADN humano genómico puede prepararse clonando fragmentos aleatorios de ADN de unas 15 kb en un vector λ. Puesto que el genoma humano es de aproximadamente 3 millones de kb, el genoma humano completo estaría representado por una colección de aproximadamente 500.000 clones de este tipo. Cualquier gen para el que haya un cebador disponible puede ser aislado a partir de una biblioteca recombinante de este tipo. Los fagos recombinantes son sembrados sobre *E. coli*, y cada fago se replica produciendo una placa de lisis sobre un césped de bacterias. Las placas son entonces adsorbidas a un filtro en un proceso similar al de la transferencia de ADN de un gel a un filtro durante un Southern blot, y los filtros son hibridados con una sonda marcada para identificar las placas de fagos que contienen el gen de interés. Una variedad de sondas pueden ser empleadas para estos experimentos. Por ejemplo, un clon de ADNc puede emplearse como sonda para aislar el clon genómico

ANIMACIÓN 4.12

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.12

Hibridación de colonias. Las bacterias pueden englobar bibliotecas de ADN recombinante, y moléculas específicas de ADN de la biblioteca pueden ser identificadas mediante el procedimiento de hibridación de colonias, un procedimiento en el que el ADN se incuba con una sonda específica de ADN.

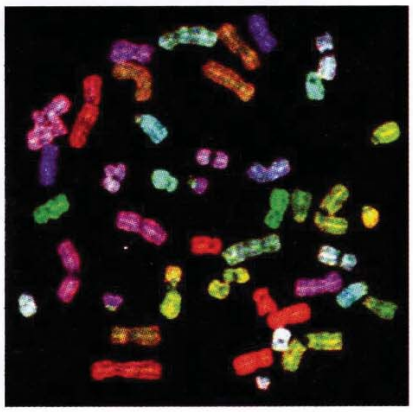


FIGURA 4.26 Hibridación *in situ* por fluorescencia. Hibridación de los cromosomas humanos con sondas fluorescentes específicas para los cromosomas, que marcan cada uno de los 24 cromosomas de un color diferente. (Cortesía de Thomas Reid y Hesed Padilla-Nash, National Cancer Institute).

correspondiente, o un gen clonado de una especie (p. ej., de ratón) puede emplearse para aislar un gen relacionado de otra especie diferente (p. ej., humano). La placa adecuada puede entonces ser aislada a partir de la placa original para propagar el fago recombinante que porta el inserto de ADN celular de interés. Procedimientos similares pueden usarse para analizar colonias bacterianas que portan clones de ADN plasmídico, de forma que pueden aislarse clones específicos mediante la hibridación tanto de librerías de fagos como plasmídicas.

La hibridación de ácidos nucleicos se emplea para detectar secuencias de ADN o ARN homólogas no sólo en extractos celulares, sino también en cromosomas o células intactas —un proceso denominado **hibridación *in situ*** (**Fig. 4.26**)—. Con esta técnica se analiza la hibridación de sondas radiactivas o fluorescentes por medio del microscopio. Por ejemplo, se emplean sondas marcadas para hibridar con cromosomas intactos con el fin de identificar la región del cromosoma que contiene un gen determinado. La hibridación *in situ* puede también emplearse para detectar ARNm específicos en los distintos tipos celulares de un tejido.

Sondas de anticuerpos para proteínas

Los estudios acerca de la expresión y función génica requieren no sólo la detección de ADN y ARN, sino también de proteínas específicas. En dichos estudios los **anticuerpos** ocupan el lugar de las sondas de ácidos nucleicos como reactantes que interaccionan de modo selectivo con moléculas proteínicas. Los anticuerpos son proteínas sintetizadas por determinadas células del sistema inmune (los linfocitos B) que reaccionan con moléculas que el organismo huésped ha reconocido como exógenas (**antígenos**) —por ejemplo, la cubierta proteínica de un virus—. Los sistemas inmunes de los vertebrados son capaces de sintetizar millones de anticuerpos diferentes, cada uno de los cuales reconoce de forma específica un antígeno en particular, que puede ser una proteína, un hidrato de carbono o una molécula no biológica. Cada linfocito produce un único tipo de anticuerpo, pero los genes responsables de la codificación de anticuerpos varían de un linfocito a otro como resultado de un proceso programado de reordenamiento génico que tiene lugar durante el desarrollo del sistema inmune (véase Cap. 7). Esta variación da lugar a un amplio espectro de linfocitos con distintos genes codificantes de anticuerpos, programados para responder contra distintos antígenos.

Los anticuerpos se generan mediante la inoculación de una proteína extraña en un animal. Por ejemplo, frecuentemente se obtienen anticuerpos contra proteínas humanas a partir de conejos. El suero de estos animales inmunizados contiene una mezcla de anticuerpos (producidos por distintos linfocitos) que reaccionan contra zonas distintas del mismo antígeno. Sin embargo, es posible obtener el mismo tipo de anticuerpo (**anticuerpos monoclonales**) cultivando líneas clonales de linfocitos B de animales inmunizados (habitualmente ratones). Dado que cada linfocito está programado para producir un tipo único de anticuerpo, una línea clonal o clon de linfocitos produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un único determinante antigénico, proporcionando un reactante inmunológico de alta especificidad.

Pueden utilizarse otros materiales para producir inmunización y sintetizar anticuerpos, aparte de proteínas celulares purificadas. Por ejemplo, es posible

ANIMACIÓN 4.13

sites.sinauer.com/cooper7e/a4.13

Anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante la inoculación de un animal (como un ratón) con un antígeno, dándole tiempo al animal para que produzca una respuesta inmune, recolectando las células B del animal, y después fusionando las células B con células inmortales de mieloma —creando así hibridomas que pueden ser analizados para la producción de anticuerpos útiles.

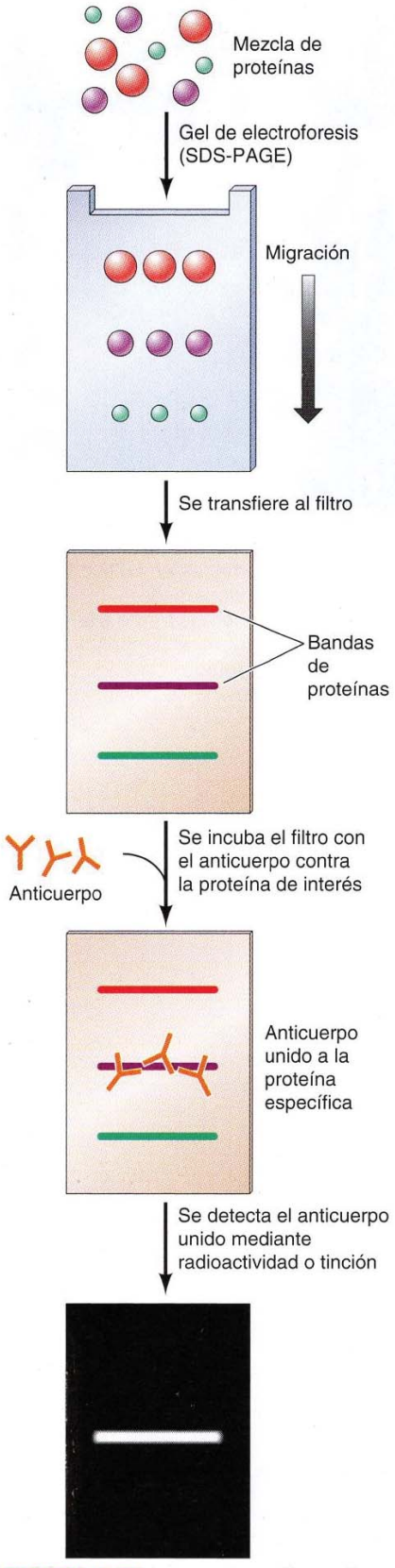


FIGURA 4.27 Inmunotransferencia.

inmunizar animales con células intactas para crear anticuerpos contra proteínas desconocidas expresadas por una línea celular específica (p. ej., una célula neoplásica). Dichos anticuerpos se utilizan para identificar proteínas específicas expresadas por la línea celular utilizada en la inmunización. Es frecuente producir anticuerpos contra proteínas expresadas en bacterias como clones recombinantes. La clonación molecular permite la obtención de anticuerpos dirigidos contra proteínas eucarióticas de difícil aislamiento. También es posible crear anticuerpos contra péptidos sintéticos de entre 10 y 15 aminoácidos, en vez de contra la proteína completa. Por lo tanto, una vez que se conoce la secuencia de un gen, se pueden producir anticuerpos dirigidos contra péptidos que constituyen parte de la secuencia proteínica. Dado que los anticuerpos contra estos péptidos sintéticos habitualmente también reaccionan contra la proteína completa, es posible producir anticuerpos contra una proteína partiendo únicamente de la secuencia de un gen clonado.

Los anticuerpos pueden ser utilizados de distintas maneras para detectar proteínas en extractos celulares. La **inmunoprecipitación** y la **inmunotransferencia** (también denominada **transferencia Western** o *Western blotting*) son dos métodos habituales. La transferencia Western (**Fig. 4.27**) es otra variación de la transferencia Southern. Las proteínas procedentes de extractos celulares son separadas por electroforesis en gel según su tamaño. Dado que las proteínas tienen formas y cargas eléctricas diferentes, este proceso requiere una modificación del método utilizado para la electroforesis de ácidos nucleicos. Las proteínas se separan por una técnica denominada electroforesis en gel de **SDS-poliacrilamida** (**SDS-PAGE**, *SDS-poliacrylamide gel electroforesis*), en la cual son disueltas en una solución con el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), cargado negativamente. Cada proteína se une a muchas moléculas del detergente, que desnaturaliza y da a la proteína una carga resultante negativa. Bajo estas circunstancias, todas las proteínas migran hacia el electrodo positivo —estando sus tasas de migración únicamente determinadas (como en el caso de los ácidos nucleicos) por el tamaño—. Tras la electroforesis las proteínas se transfieren a un filtro, que se incuba con los anticuerpos que reaccionan con la proteína de interés. El anticuerpo unido al filtro puede ser detectado de varias maneras, como la quimioluminiscencia, identificando de este modo la proteína contra la cual está dirigido el anticuerpo.

Como fue expuesto en el Capítulo 1, los anticuerpos pueden ser utilizados para visualizar proteínas en el interior de las células, así como en células lisadas. Las células se tiñen con anticuerpos marcados con pigmentos fluorescentes, tras lo cual al ser examinados con el microscopio de fluorescencia se visualiza la localización subcelular de las proteínas antigénicas (**Fig. 4.28**). Los anticuerpos pueden ser etiquetados con marcadores visibles al microscopio electrónico, como metales pesados, permitiendo la visualización de antígenos a nivel ultraestructural.

Función de los genes en eucariotas

Las técnicas de ADN recombinante descritas en las secciones previas proporcionan poderosas herramientas para el aislamiento y caracterización detallada de los genes de las células eucarióticas. Sin embargo, para entender la función de un gen es necesario analizarlo formando parte de la célula o de un organismo intacto —no simplemente como un clon molecular en una bacteria—. En la genética clásica la función de los genes ha sido puesta de manifiesto por las alteraciones en el fenotipo de los organismos mutados. La llegada del ADN recombinante ha añadido una nueva dimensión a los estudios sobre la función de los genes, dado que ha hecho posible investigar la función de un gen de forma directa reintroduciendo el ADN clonado en células culti-

vadas, así como en organismos intactos, con el fin de realizar análisis funcionales. Estos avances se pueden complementar con la posibilidad de introducir mutaciones en el ADN clonado *in vitro*, aplicando el poder de las técnicas de ADN recombinante a los estudios funcionales de los genes pertenecientes a eucariotas más complejos.

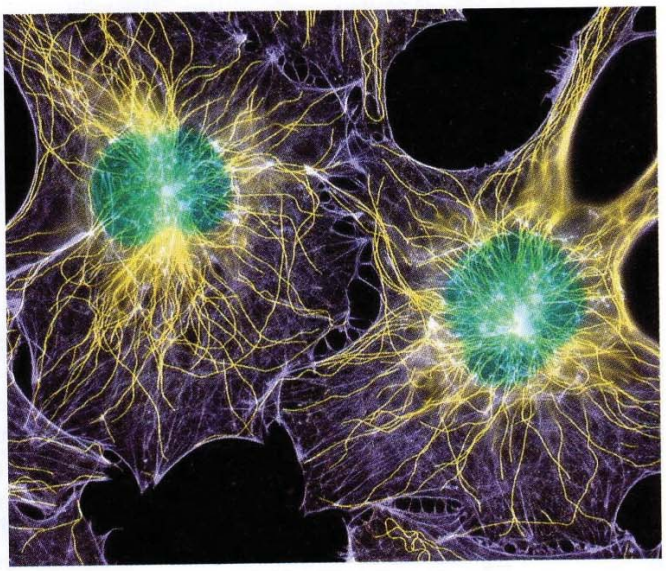


FIGURA 4.28 Inmunofluorescencia. Las células humanas en cultivo fueron teñidas con anticuerpos inmunofluorescentes frente a la actina (morado) y la tubulina (amarillo). Los núcleos están teñidos con un marcador fluorescente verde.

Transferencia de genes en plantas y animales

Pese a que las células de eucariotas complejos no son susceptibles de ser manipuladas genéticamente de forma tan sencilla como las bacterias y las levaduras, la función de los genes puede ser investigada con la introducción de ADN clonado en células de plantas y animales. Dichos experimentos (denominados de forma general **transferencia génica**) han sido de una importancia crítica para aclarar una serie de cuestiones, como los mecanismos que regulan la expresión de los genes y el procesamiento de las proteínas. Como será expuesto más adelante, la transferencia génica ha permitido la identificación y caracterización de genes que controlan el crecimiento y diferenciación de las células animales, incluyendo un cierto número de genes que son responsables del crecimiento anormal de las células neoplásicas humanas.

La metodología para la introducción de ADN en células animales fue desarrollada inicialmente para ADN víricos infecciosos y, por tanto, a menudo se denomina **transfección** (una palabra derivada de *trans*formación + in*fección*) (**Fig. 4.29**). El ADN puede introducirse en células animales en cultivo mediante una variedad de métodos, incluyendo la microinyección directa en el núcleo celular, coprecipitación de ADN con fosfato cálcico para formar pequeñas partículas que serán internalizadas por las células, incorporación del ADN en vesículas lipídicas (**liposomas**) que se fusionan con la membrana plasmática, y exposición de las células a un breve pulso eléctrico que abre, de forma transitoria, poros en la membrana plasmática (**electroporación**). El ADN internalizado por una proporción elevada de las células es transportado al núcleo, donde puede transcribirse durante varios días —un fenómeno denominado **expresión transitoria**—. En una proporción inferior de las células (generalmente un 1% o menos), el ADN extraño se integra de forma estable en el genoma de la célula y se transfiere a la progenie durante la división celular como cualquier otro gen de la célula. Estas células transformadas establemente pueden aislarse si el ADN transfectado contiene un marcador selectivo, como la resistencia a una droga que inhibe el crecimiento de las células normales. Así, cualquier gen clonado puede ser introducido en una célula mamífera transfiriéndolo junto a un marcador de resistencia a una droga que puede emplearse para aislar los transformantes estables. Los efectos de genes clonados de este modo sobre el comportamiento celular —por ejemplo, crecimiento o diferenciación celular— pueden entonces analizarse.

Los virus animales también pueden emplearse como vectores para la introducción más eficaz de ADN clonado en células. Los retrovirus son especialmente útiles en este sentido, ya que su ciclo de vida incluye una integración estable del ADN vírico en el genoma de la célula infectada (**Fig. 4.30**). Como consecuencia, los vectores retrovirales pueden emplearse para introducir eficazmente genes clonados en una variedad de tipos celulares, convirtiéndolos en un vehículo importante para una amplia gama de aplicaciones.

Es también posible introducir genes clonados en la línea germinal de un organismo multicelular, posibilitando su estudio en el contexto de un ani-

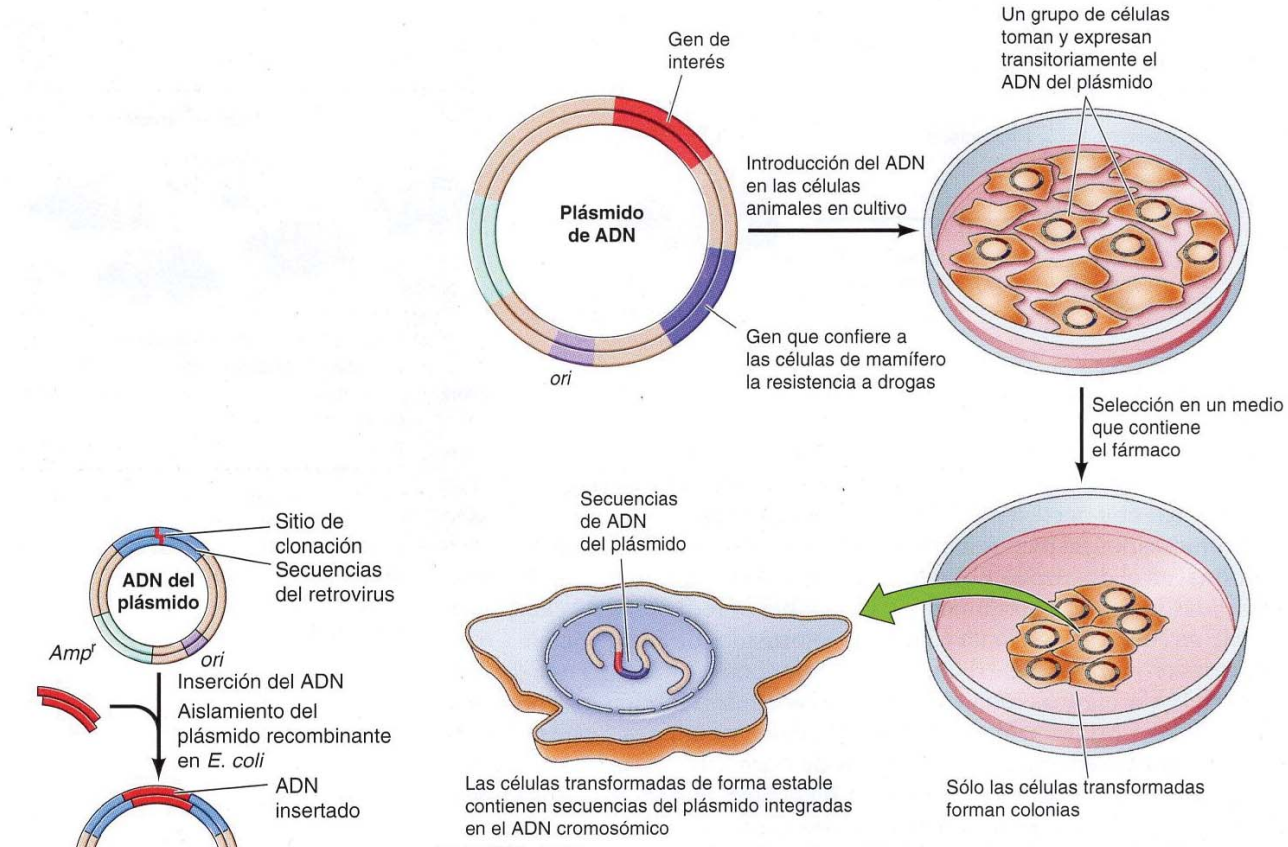


FIGURA 4.29 Introducción de ADN en células animales. Un gen eucariótico de interés es clonado en un plásmido que contiene un marcador de resistencia a un fármaco, el cual puede seleccionar las células animales en cultivo. Se introduce el ADN del plásmido en células cultivadas como un coprecipitado de calcio y fosfato, que es captado y expresado por un grupo de células durante unos días (expresión transitoria). Las células transformadas de forma estable, en las que el ADN del plásmido se integra en el ADN cromosómico, pueden seleccionarse por su capacidad de crecer en un medio que contenga el fármaco.

mal intacto en lugar de en células en cultivo. Por medio de la inyección del ADN clonado en el pronúcleo de un óvulo fertilizado se producen ratones que portan dichos genes extraños (**ratones transgénicos**) (**Fig. 4.31**). Los óvulos inyectados se implantan en madres adoptivas y se permite su desarrollo. En una parte de la progenie (aproximadamente el 10%) el ADN extraño se habrá integrado en el genoma del óvulo fertilizado y está por tanto presente en todas las células del animal. Dado que el ADN extraño está presente en las células germinales de igual forma que lo está en las so-

FIGURA 4.30 Vectores retrovirales. El vector se compone de secuencias retrovirales clonadas en un plásmido que puede propagarse en *E.coli*. El ADN extraño se inserta en las secuencias virales, y los plásmidos recombinantes pueden ser aislados a partir de las bacterias. En este momento se produce la transfección con el ADN recombinante de las células animales en cultivo. El ADN es captado por una pequeña parte de las células, que producen retrovirus recombinantes, los cuales contienen el ADN insertado. Estos retrovirus recombinantes pueden ser utilizados para infectar de manera eficaz nuevas células, donde el genoma viral con los genes insertados se integra en el ADN cromosómico en forma de provirus.

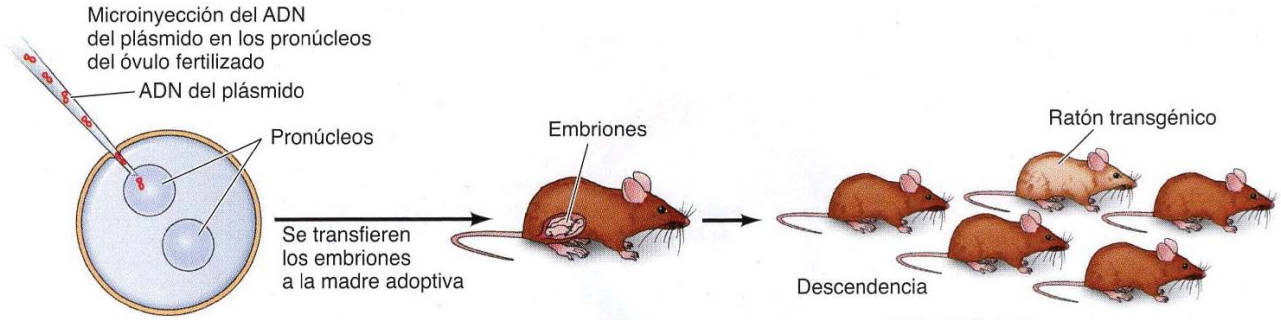


FIGURA 4.31 Producción de ratones transgénicos. El ADN es inyectado en pronúcleos de un óvulo de ratón fertilizado (los óvulos fertilizados contienen dos pronúcleos, uno del óvulo y otro del esperma). Los óvulos inyectados se transfieren a las madres adoptivas y se permite su desarrollo. Algunos de los descendientes (transgénicos) tienen incorporado en su genoma el ADN inyectado.

máticas, al reproducirse dicho ADN se transmite a su descendencia como el resto de los genes celulares.

Las propiedades de las **células madre embrionarias** (**CME**) aportan un medio alternativo para introducir genes clonados en ratones (**Fig. 4.32**). Las CME pueden obtenerse a partir de embriones tempranos de ratón. Pueden ser reintroducidos en dichos embriones tempranos, donde participan de forma normal en el desarrollo y dan lugar a células en todos los tejidos del ratón —incluidas las células germinales—. Es posible introducir ADN clonado en las CME en cultivo, seleccionar células transformadas de forma estable y reintroducirlas en embriones de ratón. Dichos embriones dan lugar a una descendencia en la que algunas células derivan de las células embrionarias normales y otras de las CME transfectadas conocida como quimérica: una mezcla de dos tipos celulares diferentes. En algunos de estos ratones las CME transfectadas se incorporan a la línea germinal. Con la reproducción de estos ratones se consigue que su progenie herede de forma directa el gen transfectado.

Los ADN clonados también pueden introducirse en células vegetales mediante distintos métodos. Dado que muchos tipos de plantas pueden regenerarse a partir de una única célula cultivada (véase Cap. 1), las plantas transgénicas se obtienen directamente de células en las que se introduce el ADN recombinante en cultivo —un procedimiento mucho más sencillo que la obtención de animales transgénicos—. Efectivamente, muchos tipos de plantas económicamente importantes, incluidos el maíz, el tomate, la soja y las patatas, son variedades transgénicas.

Mutagénesis de ADN clonados

En los estudios genéticos clásicos (p. ej., en bacterias o levaduras), la clave para identificar los genes y entender su función es la observación del fenotipo alterado de los organismos mutantes. En dichos estudios los genes mutantes son detectados porque producen cambios fenotípicos observables —como por ejemplo crecimiento termosensible o requerimientos nutricionales específicos—. Sin embargo, el aislamiento de genes por técnicas de ADN recombinante ha permitido un enfoque diferente de la mutagénesis. Ahora es posible introducir la alteración que se desee en un gen clonado y determinar el efecto de la mutación en función de los genes. La capacidad de introducir mutaciones específicas en ADN clonados (**mutagénesis *in vitro***) ha demostrado ser una poderosa herramienta en el estudio de la expresión y función de los genes eucarióticos.

Existen muchos procedimientos de mutagénesis *in vitro* para alterar genes clonados, que permiten la introducción de deleciones, inserciones o alteraciones de nucleótidos únicos. Un método básico de mutagénesis *in vitro* es el uso de oligonucleótidos sintéticos para generar cambios de nucleótidos en una secuencia de ADN (**Fig. 4.33**). En este procedimiento se emplea un oligonucleótido sintético que porta la base mutante como cebador para la síntesis de ADN. Las moléculas de ADN de nueva síntesis que contienen

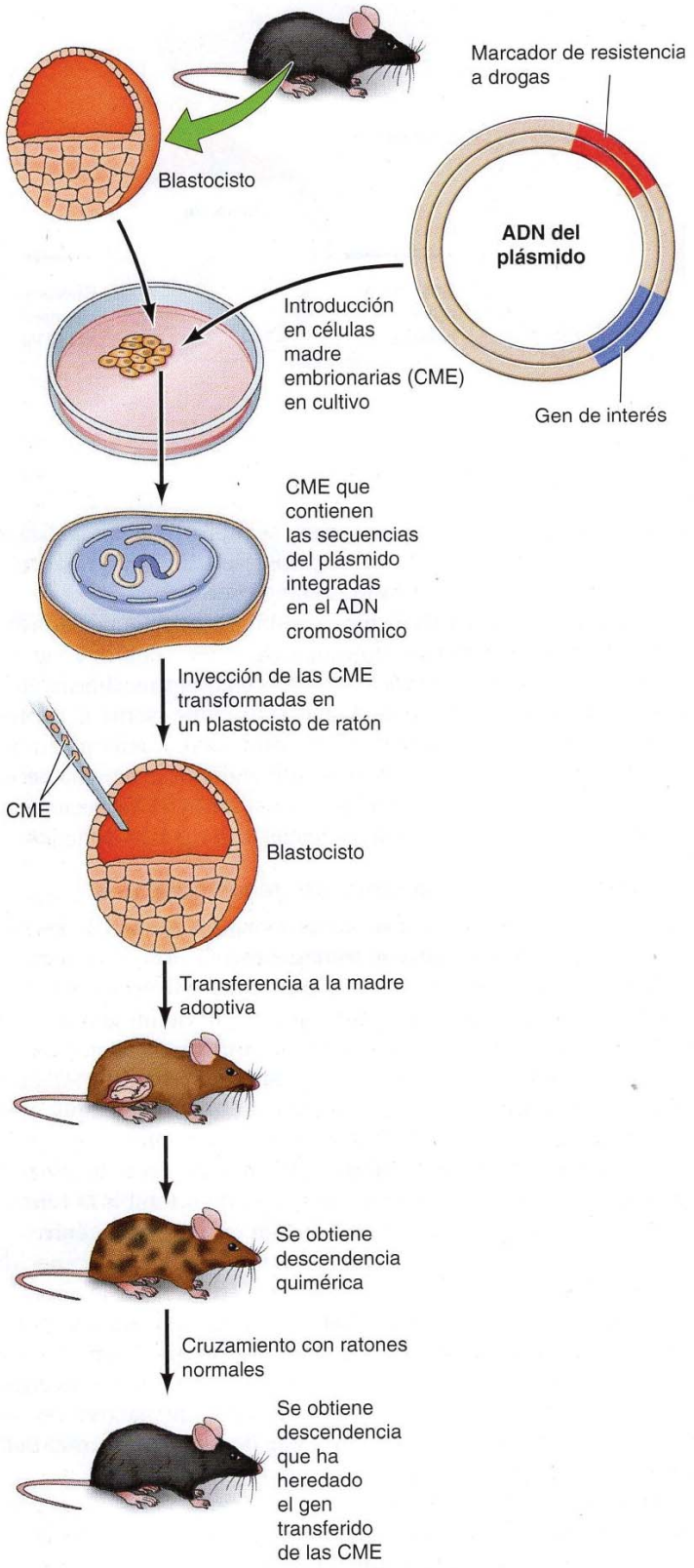


FIGURA 4.32 Introducción de genes en ratones a través de células madre embrionarias. Las células madre embrionarias son células cultivadas que proceden de embriones tempranos de ratón (blastocistos). El ADN es introducido en estas células en cultivo, y posteriormente se aíslan las células madre embrionarias transformadas de forma estable. Se inyectan estas células en un blastocisto receptor, donde son capaces de participar en el desarrollo normal del embrión. Algunos de los ratones hijos que se desarrollan tras la inyección de embriones en madres adoptivas contienen tanto células derivadas de las células madre embrionarias transformadas como células normales del blastocisto. Como estos ratones son mezcla de dos tipos de células diferentes se les denomina quiméricos. Pueden obtenerse descendientes que contengan el gen transfectado cruzando ratones quiméricos, cuyos descendientes tendrán las células madre embrionarias transformadas incorporadas en la estirpe germinal.

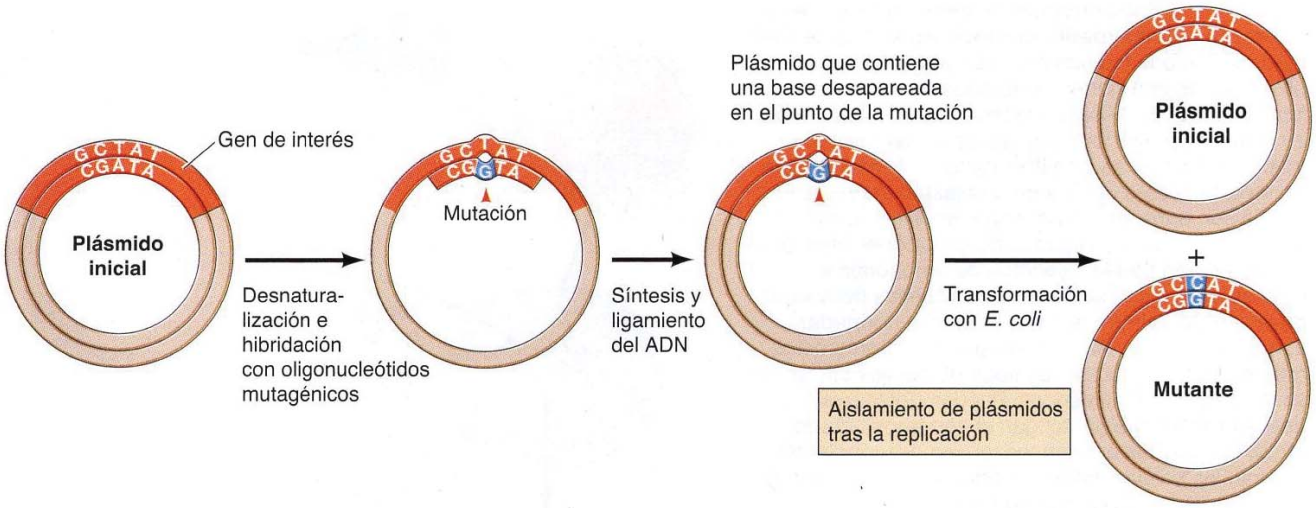


FIGURA 4.33 Mutagénesis con oligonucleótidos sintéticos. Un oligonucleótido portador de la alteración deseada en una base se utiliza como cebador en la síntesis de ADN a partir de un plásmido de ADN, produciendo un ADN circular mediante la incubación con ADN ligasa. Con este proceso se obtienen plásmidos en los cuales una cadena contiene la base normal y la otra cadena contiene la base mutada. La replicación de los plásmidos de ADN tras la transformación de *E. coli* produce, por tanto, una mezcla de plásmidos normales y mutantes.

la mutación pueden, a continuación, ser aisladas y caracterizadas. Por ejemplo, pueden modificarse aminoácidos específicos de una proteína para poder caracterizar su papel en la función proteica.

Modificaciones de esta técnica, combinadas con la versatilidad de otros métodos de manipulación de moléculas de ADN recombinante, pueden ser empleadas para introducir prácticamente cualquier modificación deseada en un gen clonado. Así, el efecto de dichas mutaciones sobre la expresión y función génica puede ser determinado a continuación, mediante la introducción del gen en el tipo celular apropiado. La mutagénesis *in vitro* ha permitido la caracterización en detalle del papel funcional tanto de las secuencias reguladoras como de las codificantes para proteínas de los genes clonados.

Introducción de mutaciones en genes celulares

Pese a que la transferencia de genes clonados dentro de las células (particularmente en combinación con mutagénesis *in vitro*) proporciona una poderosa herramienta en el estudio de la estructura y función génica, dichos experimentos no son capaces de definir la función de un gen desconocido en una célula u organismo intactos. Las células utilizadas como receptoras de genes clonados poseen copias normales de estos genes en su ADN cromosómico, y estas copias normales continúan realizando sus funciones en las células. Es preciso eliminar la actividad de las copias normales de un gen para determinar su papel biológico. Pueden emplearse diversas técnicas para inactivar las copias cromosómicas de un gen clonado o inhibir la función génica normal, tanto en células en cultivo como en ratones transgénicos.

La mutación de genes cromosómicos se basa en la capacidad de un gen clonado introducido en una célula de sufrir **recombinación homóloga** con su copia cromosómica (**Fig. 4.34**). En la recombinación homóloga, el gen clonado sustituye al alelo normal, de forma que las mutaciones introducidas en el gen clonado *in vitro* se incorporan en la copia cromosómica del gen. En el caso más sencillo, las mutaciones que inactivan (**knockout**) al gen clonado pueden introducirse en lugar de la copia normal del gen para determinar su papel en los procesos celulares.

En células animales la recombinación entre el ADN transferido y su gen homólogo es un hecho poco frecuente, por lo que la inactivación de genes por este método es más difícil que en levaduras. Sin embargo, ha sido posible desarrollar métodos para seleccionar y aislar las células transformadas en las cuales se ha producido recombinación homóloga, por lo que se pueden inactivar genes en células animales. Es importante resaltar, que estos genes pueden ser inactivados en las células madre embrionarias en el ratón, y éstas

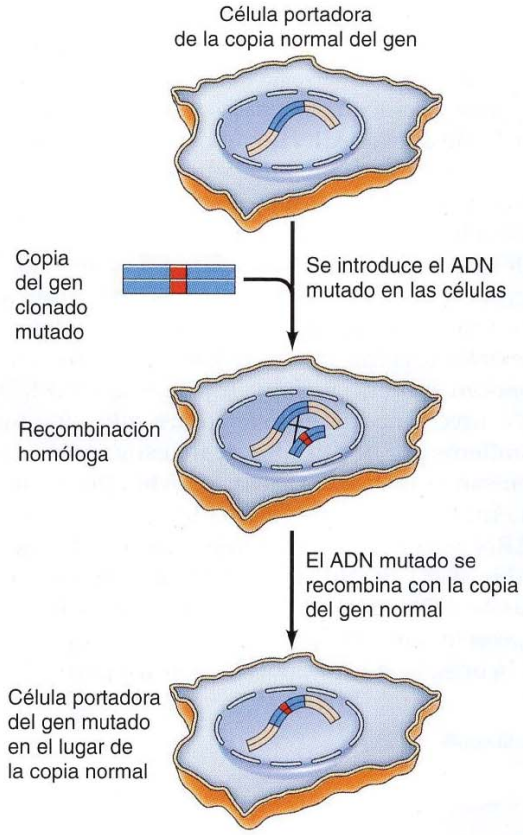


FIGURA 4.34 Inactivación génica mediante recombinación homóloga. Una copia mutada del gen clonado es introducida dentro de las células. El gen clonado puede sustituir a la copia del gen normal por recombinación homóloga, obteniéndose una célula que transporta la mutación deseada en su ADN cromosómico.

pueden usarse después para generar ratones transgénicos (**Fig. 4.35**). Estos ratones pueden criarse y generar progenie que contiene copias mutadas del gen diana en ambos cromosomas homólogos, de forma que los efectos de la inactivación de un gen pueden investigarse en el contexto de un animal intacto. Adicionalmente, pueden cultivarse las células obtenidas a partir de embriones de ratón y que contienen copias del gen mutado, de modo que pueden estudiarse las funciones de genes diana en el cultivo celular. Las actividades biológicas de alrededor de 7.000 genes de ratón han sido investigadas de este modo, y dichos estudios han sido de importancia crítica para el descubrimiento del papel de muchos genes en el desarrollo del ratón. También se han desarrollado técnicas para inactivar condicionalmente los genes en tejidos específicos del ratón, permitiendo estudiar la función de un gen en un tipo celular concreto (p. ej., en células nerviosas) en lugar de en todas las células del organismo.

Ingeniería genómica mediante el sistema CRISPR/Cas

La introducción de mutaciones en genes celulares mediante los métodos tradicionales de recombinación homóloga sigue siendo difícil y necesita mucho tiempo. Para facilitar el proceso se han desarrollado varios enfoques dirigidos a mejorar la facilidad y la eficacia del direccionamiento génico mediante el empleo de nucleasas específicas del sitio para escindir de manera específica secuencias deseadas en los genomas celulares. Los primeros métodos utilizaban proteínas recombinantes en las cuales las nu-

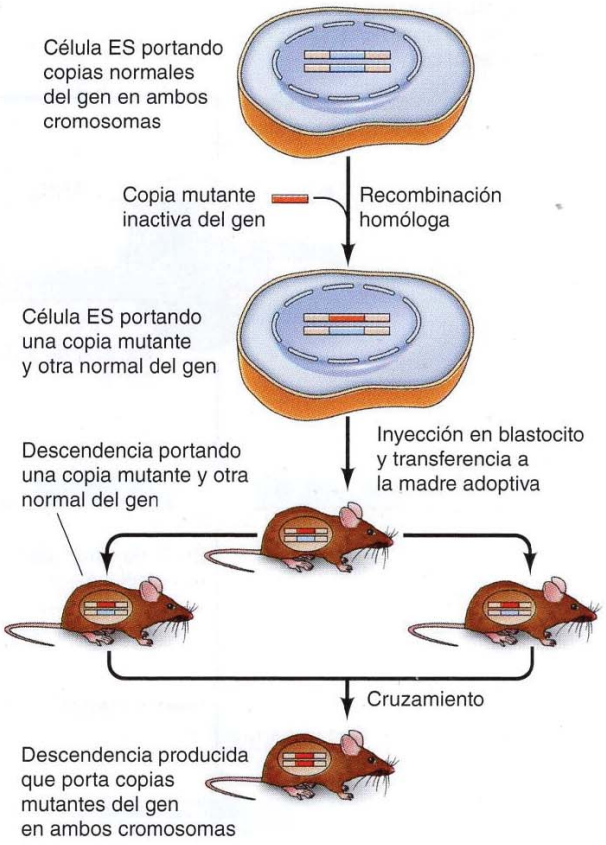


FIGURA 4.35 Producción de ratones mutantes mediante recombinación homóloga en células madre. La recombinación homóloga se emplea para sustituir un gen normal con una copia mutante inactiva en células madre embriónicas (células ES: *embryonic stem*), resultando en células ES que portan una copia normal y una inactiva del gen en cromosomas homólogos. Estas células ES pueden ser transferidas a blastocistos y empleadas para generar ratones progenie como se describe en la Figura 4.32. Esos ratones, portando una copia mutante y otra normal del gen, pueden entonces cruzarse para producir descendencia que porta copias mutantes del gen en ambos cromosomas.

cleasas se unían con dominios de unión a ADN diseñados especialmente que reconocían secuencias de ADN de 20-30 bases, presentes exclusivamente dentro de un gen diana deseado. Recientemente se ha desarrollado un método en el que secuencias diana específicas son reconocidas por una molécula de ARN, y no por una proteína. Dado que los ARN homólogos con cualquier secuencia deseada pueden ser sintetizados fácilmente, este enfoque (denominado **sistema CRISPR/Cas**) es un método versátil y eficaz para introducir mutaciones génicas dirigidas en células de mamíferos.

Las CRISPR (siglas en inglés de repeticiones palindrómicas interespaciadas agrupadas regularmente)/Cas (del inglés, sistemas asociados a CRISPR) fueron descubiertas en bacterias, donde se utilizan como defensa frente a elementos genéticos extraños, como virus o plásmidos. Consisten en ARN de CRISPR que reconocen secuencias diana específicas y proteínas Cas que escinden los ADN direccionados. El sistema fue aplicado por primera vez en células de mamíferos por dos grupos de investigadores en 2013. Los plásmidos que expresan la nucleasa Cas9 y un ARN guía, que contiene secuencias complementarias al gen direccionado, se introducen en células de mamíferos. El ARN guía forma un complejo con Cas9, y lleva Cas9 al gen direccionado (**Fig. 4.36**). Según la variante de Cas9 utilizada, puede cortar las dos hebras de ADN, para introducir una rotura de doble hebra, o sólo una de ellas, con lo que introduce una rotura de una sola hebra. Si se escinden las dos hebras, la rotura doble se cubrirá probable-

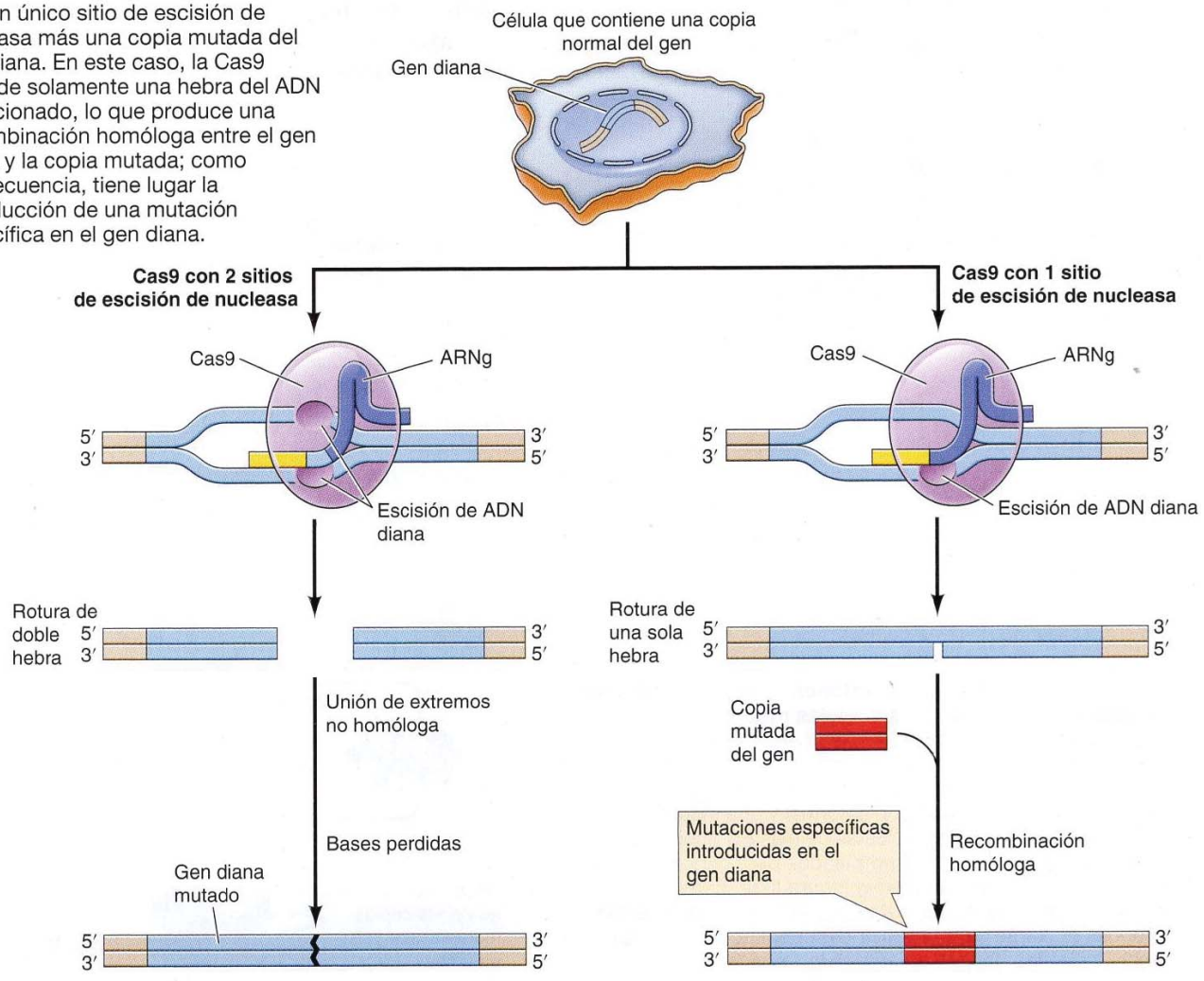


FIGURA 4.36 Direccionamiento génico por CRISPR/Cas. Se introducen plásmidos que expresan un ARN guía (ARNg) con secuencias homólogas al gen diana y la nucleasa Cas9. El ARNg dirige la Cas9 hacia el gen diana. Se utilizan dos variantes de Cas9. Si Cas9 contiene dos sitios de escisión de nucleasa, introduce una rotura de doble hebra en el ADN direccionado. La reparación de esta rotura mediante recombinación no homóloga introduce mutaciones aleatorias en el gen diana. Alternativamente, puede introducirse en las células una variante de Cas9 con un único sitio de escisión de nucleasa más una copia mutada del gen diana. En este caso, la Cas9 escinde solamente una hebra del ADN direccionado, lo que produce una recombinación homóloga entre el gen diana y la copia mutada; como consecuencia, tiene lugar la introducción de una mutación específica en el gen diana.

mente con mutaciones introducidas en el lugar de escisión, lo que con frecuencia deriva en la inactivación del gen direccionado. Si se escinde una sola hebra, la rotura promueve una recombinación eficiente si en la célula hay también una secuencia de ADN homóloga. De este modo, al introducir una copia mutante del gen direccionado, junto con un ARN guía y Cas9, se obtiene la introducción de forma muy eficaz de mutaciones específicas por recombinación homóloga. Este tipo de ingeniería genética se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de células en cultivo, entre ellas células ES, lo que permite la rápida generación de ratones portadores de las mutaciones deseadas.

Interferencia con la expresión génica celular

Como alternativa a la inactivación mediante recombinación homóloga, pueden emplearse una diversidad de técnicas para interferir específicamente con la expresión o función génica. Un método que se ha empleado para inhibir la expresión de un gen diana deseado es la introducción de **ácidos nucleicos antisentido** en células de cultivo (**Fig. 4.37**). ARN o ADN monocatenario complementario al ARNm del gen de interés (antisentido) hibrida con el ARNm y bloquea la traducción de la proteína. Adicionalmente, los híbridos ARN-ADN resultantes de la introducción de moléculas de ADN antisentido generalmente son degradados en el interior celular. Los ARN antisentido pueden introducirse directamente en las células, o las células pueden ser transfectadas con vectores que han sido diseñados para expresar ARN antisentido. El ADN antisentido suele estar en forma de oligonucleótidos cortos (de unas 20 bases de longitud), que pueden ser transfectados en las células, o en muchos casos son internalizados por las células directamente desde el medio de cultivo.

La **interferencia por ARN (ARNi)** ha emergido recientemente como un método altamente eficaz y ampliamente utilizado para interferir con la expresión génica a nivel del ARNm. La interferencia por ARN fue descubierta por primera vez en *C. elegans* en 1998, cuando Andrew Fire, Craig Mello y sus colaboradores encontraron que la infección de ARN de doble hembra inhibía la expresión de un gen con una secuencia de ARNm complementaria. Esta inesperada observación demostró un papel no anticipado para el ARN de doble hebra en la regulación génica, que fue desarrollado posteriormente para dar lugar a una potente herramienta experimental para inhibir la expresión de genes diana. Cuando los ARN de doble hebra son introducidos en la célula, son escindidos en pequeñas moléculas de doble hebra (21-23 nucleótidos) por una enzima denominada Dicer (**Fig. 4.38**). Estas moléculas bicatenarias cortas, denominados ARN cortos de interferencia (*short interfering RNAs:* siRNA), se asocian con un complejo de proteínas conocido como el

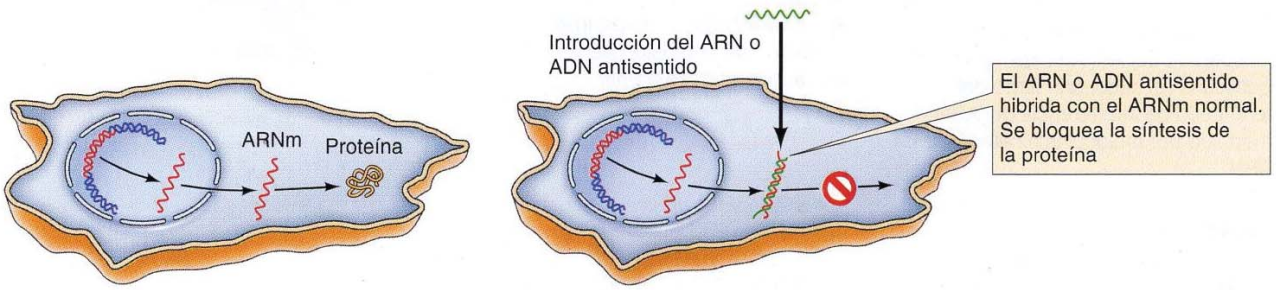
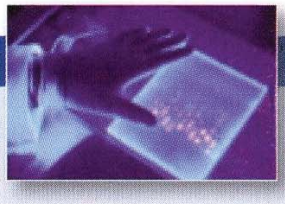


FIGURA 4.37 Inhibición de la expresión génica mediante ARN o ADN antisentido. El ARN o el ADN de cadena única antisentido son complementarios al ARNm de un gen de interés. Los ácidos nucleicos antisentido forman, por tanto, híbridos con los ARNm diana, bloqueando la traducción del ARNm a proteína.



EXPERIMENTO CLAVE

Interferencia del ARN

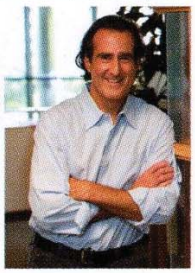
Interferencia génica potente y específica del ARN bicatenario en *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver, y Craig C. Mello

Carnegie Institute of Washington, Baltimore, MD, y University of Massachussets, Worcester, MA. EEUU,

Nature, Volumen 391, 1998, páginas 806-811

Andrew Fire



Craig Mello

Fotografía Andrew Fire: Cortesía de Linda A. Cicero/*Stanford News Service.* Fotografía Craig Mello: Cortesía de *University of Massachusetts Medical School.*

Contexto

El ARN antisentido comenzó a utilizarse en 1984 y más adelante se aplicó como método experimental de inhibición de la expresión génica en diversos modelos animales, como *C. elegans.* Se creía que la inhibición de la expresión génica por el ARN antisentido se debía a la hibridación con un ARNm diana (sentido) y el bloqueo de su traducción. No obstante, los resultados obtenidos en algunos experimentos control no concordaban con tal mecanismo de acción. Concretamente, en 1991 Andrew Fire y cols. observaron que los plásmidos que expresaban moléculas sentido y antisentido de ARN interferían en la expresión génica en células musculares de *C. elegans* (*Development* 113:503). De manera similar, en 1995 Su Guo y Kenneth Kemphues comprobaron que la inyección de moléculas sentido y antisentido de ARN afectaba a la función de un gen de *C. elegans* necesario para el desarrollo embrionario inicial (*Cell* 81:611). Estos resultados fueron sorprendentes y de origen desconocido, ya que se suponía que las moléculas sentido de ARN no hibridarían con una molécula diana de ARNm. Andrew Fire, Craig Mello y su grupo de investigación se propusieron estudiar el motivo de esta actividad inesperada del ARN sentido, y en 1998 publicaron el descubrimiento del fenómeno de interferencia del ARN mediado por moléculas bicatenarias de ARN.

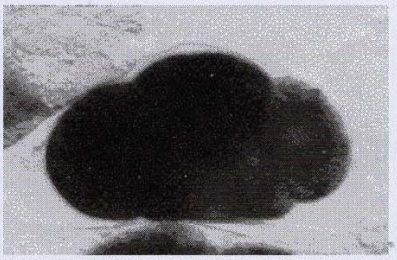
Experimentos

Cabría esperar que los plásmidos modificados para producir moléculas sentido o antisentido de ARN generaran también unas cantidades reducidas de la hebra contraria, por lo que Fire, Mello y cols. concluyeron que las preparaciones de ARN sentido y antisentido contendrían pequeñas cantidades de ARN bicatenario *cf* que podría estar implicado en la inhibición de la expresión génica. Para estudiar esta hipótesis, compararon las actividades inhibidoras de varios genes de *C. elegans* de híbridos de ARN bicatenario y moléculas monocatenarias sentido y antisentido de ARN. En todos los casos, las moléculas bicatenarias de ARN ejercieron un efecto inhibidor mucho más potente de la función génica que las moléculas monocatenarias antisentido de ARN. Además, la inyección de ARN bicatenario daba lugar a una degradación extensa del ARNm diana, mientras que el efecto del ARN monocatenario antisentido era leve (véase figura). Al investigar con detalle los sorprendentes resultados de un experimento control, los autores descubrieron que el ARN bicatenario constituía una herramienta potente y específica de inhibición de la expresión génica.

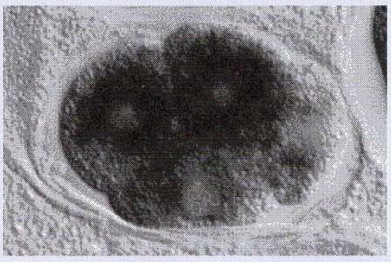
Influencia

El descubrimiento fortuito de la interferencia del ARN no posibilitó únicamente el desarrollo de un nuevo y eficacísimo método experimental de inhibición de la función génica, sino que supuso también una transformación radical de nuestra concepción de los mecanismos de regulación de la expresión génica en las células eucariotas. Las moléculas bicatenarias de ARN son una potente

(A) **Control sin inyección**



(B) **Inyección de ARN antisentido**



(C) **Inyección de ARN bicatenario**

Los embriones *C. elegans* se inyectaron con antisentido o ARN bicatenario homólogo a ARNm *mex*-3. El nivel de ARNm en los embriones se estableció por hibridación *in situ* (señalado por tinción oscura). Con la inyección de ARN bicatenario, no de antisentido, el ARN perdió el ARNm diana *mex*-3.

EXPERIMENTO CLAVE

herramienta de experimentación que hoy en día se aprovechan para interferir en la expresión génica en un gran número de modelos experimentales, como los cultivos de células de mamífero. Sin embargo, ha resultado aún más sorprendente el reconocimiento cada vez mayor de las funciones reguladoras que desempeñan habitualmente el ARN bicatenario en las células eucariotas. En su artículo de 1998, Fire y Mello señalaron que «es posible que el mecanismo que sustenta la interferencia del ARN tenga una finalidad biológica. Las células podrían emplear la interferencia genética del ARN bicatenario para llevar a cabo un silenciamiento fisiológico de ciertos genes». Los trabajos realizados posteriormente han logrado confirmar esta predicción y en la actualidad se considera que el ARN bicatenario es uno de los principales reguladores de la expresión génica en las células eucariotas. Se han identificado 1.000 RNA reguladores que no codifican proteínas (denominados microARN) en los mamíferos y se ha comprobado que la regulación génica ejercida por los microARN juega un papel destacado en diversos procesos celulares, como la señalización celular, la supervivencia celular, el desarrollo cardíaco y cerebral, y el cáncer. A cada microARN le corresponde un gran número de dianas de ARNm y se cree que los microARN intervienen en la regulación de más de 5.000 genes en el ser humano. El descubrimiento de la interferencia del ARN gracias a la obtención de resultados sorprendentes en un experimento control ha revolucionado nuestra comprensión de la regulación génica.

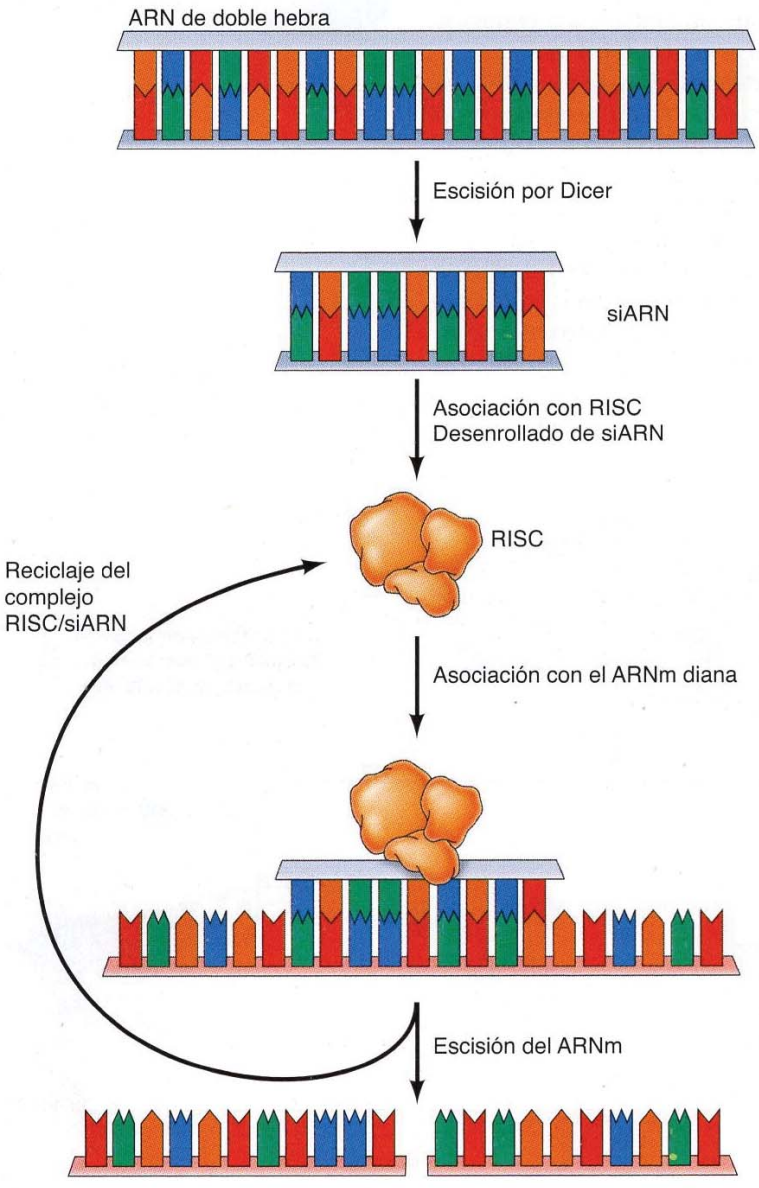


FIGURA 4.38 Interferencia de ARN. Moléculas de ARN de doble hebra son escindidas por la enzima Dicer en ARN pequeños e interferentes (siRNA: *short interfering RNA*). Los siARN se asocian con el complejo silenciador inducido por RNA (RISC: RNA *induced silencing complex*) y son desenrollados. La hebra antisentido del siARN dirige a RISC a un ARNm homólogo, que es escindido por una de las proteínas RISC. El complejo RISC-siARN es liberado y puede participar en posteriores ciclos de degradación de ARNm.

complejo silenciador inducido por ARN (RISC: *RNA-induced silencing complex*). Dentro de este complejo, las dos hebras del siARN se separan y la hebra complementaria al ARNm (hebra antisentido) guía al complejo hacia la diana de ARNm como consecuencia de la complementareidad de bases. El ARNm es entonces escindido por una de las proteínas del RISC. El complejo RISC-siARN es liberado después de la degradación del ARNm y puede continuar con su participación en múltiples ciclos de degradación de ARNm, dando lugar a una eficiente destrucción del ARNm diana.

La ARNi se ha establecido como un potente método para la interferencia de la expresión génica en *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* y células de mamífero, y proporciona una técnica relativamente directa para investigar la función de cualquier gen de secuencia conocida. Adicionalmente, se están empleando bibliotecas de ARN bicatenarios o siARN que cubren una gran parte de los genes del genoma, para analizar *C. elegans*, *Drosophila* y células humanas para identificar nuevos genes implicados en funciones biológicas específicas, como el crecimiento o la supervivencia celular. Finalmente, el ARNi no es únicamente una herramienta experimental: como se describirá en los Capítulos 8 y 9, la interferencia por ARN es también uno de los principales mecanismos de regulación empleados por las células para controlar la expresión génica tanto a nivel transcripcional como traduccional.

Además de inactivar un gen o de inducir la degradación de un ARNm, a veces es posible interferir directamente con la función de las proteínas en el interior celular (**Fig. 4.39**). Una técnica consiste en microinyector anticuerpos que bloquean la actividad de la proteína frente a la que están dirigidos. Alternativamente, algunas proteínas mutantes interfieren con la función de sus homólogos normales cuando se expresan en la misma célula —por ejemplo, compitiendo con la proteína normal por la unión a su molécula diana—. Los ADN clonados que codifican para tales proteínas mutantes (denominadas **mutantes dominantes inhibitorios**) pueden introducirse en las células mediante transferencia génica y ser empleados para estudiar los efectos de bloquear la función génica normal.

◆ Tanto los oligonucleótidos antisentido como el siARN están siendo investigados como potenciales agentes terapéuticos, especialmente para el tratamiento de infecciones víricas.

VÍDEO 4.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v4.1

Interferencia de ARN. La interferencia de ARNi es un importante proceso que regula la actividad de ARN cortos de interferencias (siARN) y microARNs (miARN).

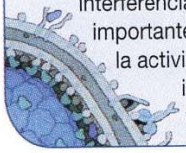
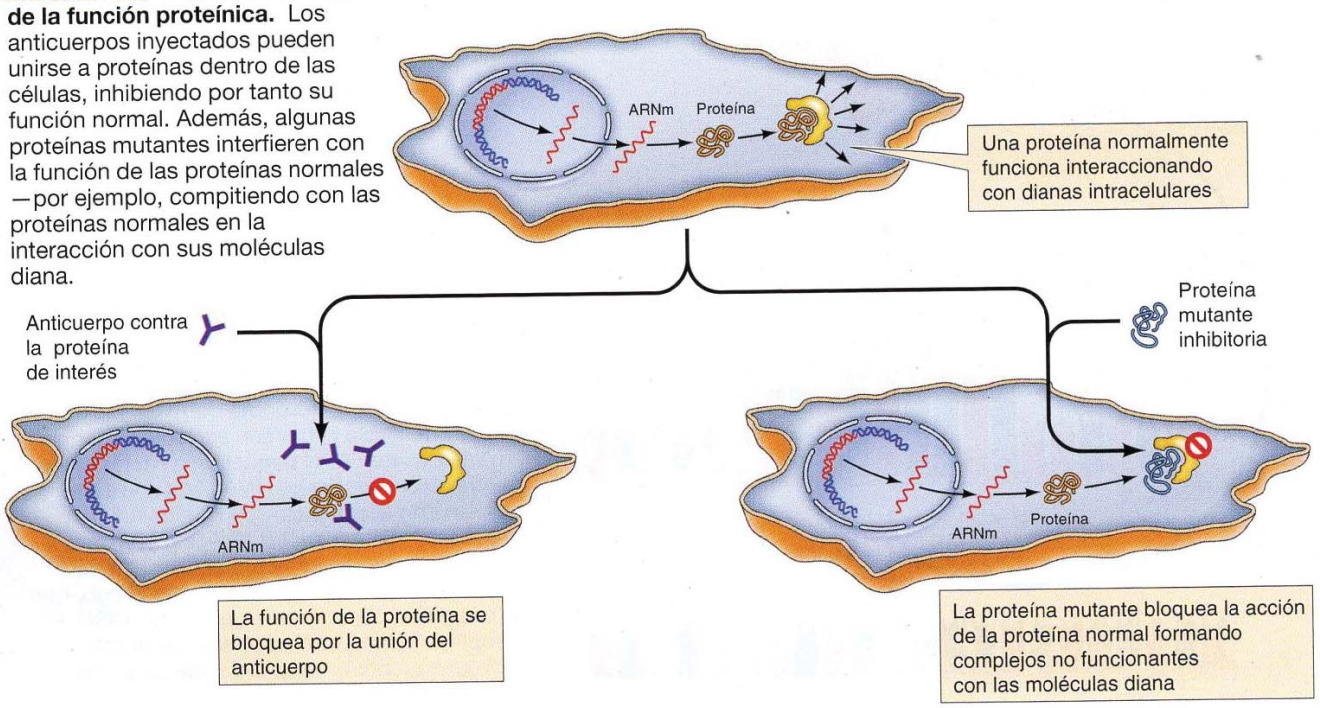


FIGURA 4.39 Inhibición directa de la función proteínica. Los anticuerpos inyectados pueden unirse a proteínas dentro de las células, inhibiendo por tanto su función normal. Además, algunas proteínas mutantes interfieren con la función de las proteínas normales —por ejemplo, compitiendo con las proteínas normales en la interacción con sus moléculas diana.



RESUMEN

Herencia, genes y ADN

Genes y cromosomas: Los cromosomas son los portadores de los genes.

gen, alelo, dominante, recesivo, genotipo, fenotipo, cromosoma, diploide, meiosis, haploide, mutación

Genes y enzimas: Los genes especifican la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

Identificación del ADN como material genético: Se identificó el ADN como material genético gracias a experimentos de transformación bacteriana.

transformación

Ver Animaciones 4.1 y 4.2

Estructura del ADN: El ADN es una doble hélice en la que se forman enlaces de hidrógeno entre las purinas y las pirimidinas de cadenas opuestas. Debido al apareamiento específico de bases —A con T y G con C— las dos cadenas de una molécula de ADN tienen una secuencia complementaria.

Replicación del ADN: El ADN se replica por un mecanismo semiconservativo, en el que las dos cadenas se separan y cada una sirve de modelo para la síntesis de una nueva cadena hija.

replicación semiconservativa, ADN polimerasa

Expresión de la información genética

Colinearidad entre genes y proteínas: El orden de los nucleótidos en el ADN determina el orden de los aminoácidos en las proteínas.

Papel del ARN mensajero: El ARN mensajero funciona como intermediario en el transporte de la información desde el ADN hasta los ribosomas, donde se utiliza como molde en la síntesis de proteínas.

dogma central, transcripción, traducción, ARN mensajero (ARNm), ARN polimerasa, ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt)

Código genético: El ARN de transferencia o transferente se utiliza como adaptador entre los aminoácidos, y el ARNm durante la síntesis proteínica. Cada aminoácido se especifica por un codón que consta de tres nucleótidos.

código genético, traducción *in vitro*, codón

Ver Animaciones 4.3 y 4.4

Virus ARN y transcripción inversa: Se puede sintetizar el ADN a partir de moldes de ARN, como fue descubierto en los retrovirus en primer lugar.

retrovirus, transcripción inversa, transcriptasa inversa

Ver Animación 4.5

ADN recombinante

Endonucleasas de restricción: Las endonucleasas de restricción cortan secuencias de ADN específicas, obteniéndose fragmentos definidos a partir de moléculas de ADN.

endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, mapa de restricción

Ver Animación 4.6

Generación de moléculas de ADN recombinante: Las moléculas de ADN recombinante constan de un fragmento de ADN de interés ligado a un vector que es capaz de replicarse independientemente en una célula huésped apropiada.

clonación molecular, vector, molécula recombinante, clon molecular, ligasa de ADN, ADNc

Ver Animación 4.7

Vectores para ADN recombinante: Se utilizan diversos vectores para clonar fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

origen de la replicación, cósmido, cromosoma artificial P1 (PAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC)

PALABRAS CLAVE

RESUMEN	PALABRAS CLAVE
Secuenciación del ADN: La secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ADN clonados se puede determinar fácilmente. **Ver Animación 4.8**	**dideoxinucleótido, secuenciación de la siguiente generación**
Expresión de los genes clonados: Las proteínas codificadas por los genes clonados pueden expresarse a gran escala tanto en bacterias como en células eucariotas.	**vector de expresión**
Detección de ácidos nucleicos y proteínas	
Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La PCR permite la amplificación y aislamiento de fragmentos específicos de ADN *in vitro*, proporcionando un método sensible para la detección de pequeñas cantidades de moléculas de ADN o ARN específicas. **Ver Animación 4.9**	**reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tiempo real PCR**
Hibridación de ácidos nucleicos: La hibridación de ácidos nucleicos permite detectar secuencias concretas de ADN o ARN mediante el apareamiento de bases entre hebras complementarias. **Ver Animaciones 4.10-4.12**	**hibridación de ácidos nucleicos, transferencia Southern, transferencia Northern, biblioteca de ADN recombinante, hibridación *in situ***
Anticuerpos como sondas para proteínas: los anticuerpos pueden ser utilizados para detectar proteínas específicas en células o extractos celulares. **Ver Animación 4.13**	**anticuerpo, antígeno, anticuerpo monoclonal, inmunotransferencia, transferencia Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)**
Función de los genes en eucariotas	
Transferencia génica en plantas y animales: Los genes clonados pueden ser introducidos en células eucariotas complejas y en organismos multicelulares para su análisis funcional.	**transferencia génica, transfección, liposoma, expresión transitoria, electroporación, ratón transgénico, célula madre embrionaria (CME)**
Mutagénesis de ADN clonado: La mutagénesis *in vitro* del ADN clonado sirve para estudiar el efecto de las mutaciones en la función génica.	**mutagénesis *in vitro***
Introducción de mutaciones en genes celulares: Pueden introducirse mutaciones en las copias de genes cromosómicos mediante la recombinación homóloga con secuencias de ADN clonadas.	**recombinación homóloga, mutante inhibitorio**
Ingeniería genética mediante el sistema CRISPR/Cas: El sistema CRISPR/Cas puede utilizarse para dirigirse de manera eficaz a genes deseados para mutación o recombinación homóloga.	**sistema CRISPR/Cas**
Interferir con la expresión génica celular: La expresión o función de genes específicos puede ser bloqueada mediante ácidos nucleicos antisentido, interferencia de ARN, o mutantes dominantes inhibitorios. **Ver Vídeo 4.1**	**ácido nucleico antisentido, interferencia del ARN (ARNi), mutante inhibitorio**

Preguntas

1. ¿Cómo determinarías si dos genes diferentes están ligados en *Drosophila*?
2. Se crece *E. coli* durante varias generaciones en medio que contiene N^{15}. Las células se transfieren a un medio que contiene N^{14} y crecen durante dos generaciones adicionales. ¿Qué proporción del ADN aislado a partir de estas células será de densidad pesada, ligera o intermedia?
3. La adición o deleción de uno o más nucleótidos en la parte codificante de un gen produce una proteína no funcional, mientras que la adición o deleción de tres nucleótidos a menudo produce una proteína con una función casi normal. Explícalo.
4. Describe las características que debe poseer un cromosoma artificial de levaduras para clonar un fragmento de ADN humano cortado con *Eco*RI en levadura.
5. Estás estudiando una enzima en la cual existe un residuo de cisteína activo que está codificado por el triplete UGU. ¿Cómo afectaría a la función enzimática la mutación de la tercera base por una C? ¿Y la mutación por una A?
6. La digestión de una molécula de ADN de 4 kb con *Eco*RI produce dos fragmentos de 1 kb y 3 kb cada uno. La digestión de la misma molécula con *Hin*dIII proporciona fragmentos de 1,5 kb y 2,5 kb. Por último, tras la digestión combinada con *Eco*RI y *Hin*dIII se obtienen fragmentos de 0,5 kb, 1 kb y 2,5 kb. Dibuja el mapa de restricción indicando la posición de los puntos de corte de *Eco*RI y *Hin*dIII.
7. Comenzando con ADN de un solo espermatozoide, ¿cuántas copias de una secuencia génica específica se conseguirán después de 10 ciclos de amplificación con PCR? ¿Y tras 30 ciclos?
8. Has clonado un fragmento de ADN genómico humano en un vector cosmídico; aproximadamente cuántas veces esperarías que el inserto sea cortado por una enzima de restricción *Bam*HI?
9. ¿Cuál es el número mínimo de clones de cromosoma artificial bacteriano (CAB) necesarios para construir una biblioteca genómica de ADN humano?
10. ¿Cómo esperarías que la actinomicina D afecte a la replicación del virus de la gripe?
11. ¿Cuál es la característica crítica de un vector de clonación que te permitiría aislar células de mamíferos transfectadas de forma estable?
12. Los ácidos nucleicos tienen una carga neta negativa y pueden separarse mediante electroforesis en gel en base a su tamaño. Por el contrario, distintas proteínas tienen diferentes cargas. ¿Cómo, entonces, pueden separarse proteínas en función de su tamaño mediante electroforesis?
13. ¿Cómo actúa el sistema CRISPR/Cas para incrementar la eficacia de la recombinación homóloga en genes diana?

Bibliografía

Herencia, genes y ADN

Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79: 137–158. [P]

Franklin, R. E. and R. G. Gosling. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171: 740–741. [P]

Kornberg, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131: 1503–1508. [P]

Kresge, N., R. D. Simoni and R. L. Hill. 2005. Launching the age of biochemical genetics with *Neurospora*: The work of George Wells Beadle. *J. Biol. Chem.* 280: e9–e11. [R]

Lehman, I. R. 2003. Discovery of DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278: 34733–34738. [R]

Meselson, M. and F. W. Stahl. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 671–682. [P]

Watson, J. D. and F. H. C. Crick. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964–967. [P]

Watson, J. D. and F. H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737–738. [P]

Wilkins, M. H. F., A. R. Stokes and H. R. Wilson. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171: 738–740. [P]

Expresión de la información genética

Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209–1211. [P]

Brenner, S., F. Jacob and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576–581. [P]

Crick, F. H. C., L. Barnett, S. Brenner and R. J. Watts-Tobin. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227–1232. [P]

Ingram, V. M. 1957. Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 180: 326–328. [P]

Nirenberg, M. 2004. Historical review: Deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* 29: 46–54. [R]

Nirenberg, M. and P. Leder. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399–1407. [P]

Nirenberg, M. W. and J. H. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1588–1602. [P]

Temin, H. M. and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211–1213. [P]

Yanofsky, C. 2007. Establishing the triplet nature of the genetic code. *Cell* 128: 815–818. [R]

ADN recombinante

Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806–812. [P]

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240–3244. [P]

Green, M. R. and J. Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Nathans, D. and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 273–293. [R]

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467. [P]

Detección de ácidos nucleicos y proteínas

Ausubel, F. M. ed. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: J. Wiley and Sons.

Caruthers, M. H. 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 230: 281–285. [R]

Grunstein, M. and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961–3965. [P]

Harlow, E. and D. Lane. 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497. [P]

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491. [P]

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503–517. [P]

Función de los genes en eucariotas

Branda, C. S. and S. M. Dymecki. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Devel. Cell* 6: 7–28. [R]

Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27155–27158. [R]

Capecchi, M. R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Rev. Genet.* 6: 507–512. [R]

Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R.Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819–823. [P]

Doudna, J. A. and E. Charpentier. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096. [R]

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811. [P]

Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329: 219–222. [R]

Hsu, P. D., E. S. Lander and F. Zhang. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157: 1262–1278. [R]

Izant, J. G. and H. Weintraub. 1984. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36: 1007–1015. [P]

Kim, H. and J.-S. Kim. 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Rev. Genet.* 15: 321–334. [R]

Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427–1429. [P]

Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville and G. M. Church. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823–826. [P]

Mello, C. C. and D. Conte Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338–342. [R]

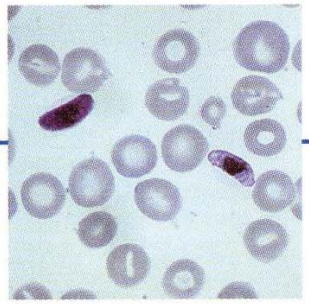
Nilsen, T. W. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 23:243–249. [R]

Novina, C. D. and P. A. Sharp. 2004. The RNAi revolution. *Nature* 430: 161–164. [R]

Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20: 465–499. [R]

Sampson, T. R. and D. S. Weiss. 2013. Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays* 36: 34–38. [R]

Smith, M. 1985. *In vitro* mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* 19: 423–462. [R]



Capítulo 5

Genómica, proteómica y biología de sistemas

Genomas y transcriptomas 157

Proteómica 167

Biología de sistemas 173

EXPERIMENTO CLAVE:
Genoma humano 161

MEDICINA MOLECULAR:
Malaria y biología sintética 180

En los últimos años se han producido cambios importantes en la forma en que los científicos enfocan la biología celular y molecular, de manera que se aplican enfoques experimentales y computacionales a gran escala para comprender la complejidad de los sistemas biológicos. Tradicionalmente, los biólogos celulares y moleculares estudiaban uno o varios genes o proteínas al mismo tiempo. Este acercamiento cambió con los proyectos de secuenciación de genes, que introdujeron métodos experimentales a gran escala en los que se generaban enormes cantidades de datos para el estudio de sistemas biológicos. Las secuencias de genomas completos de una amplia variedad de organismos, entre ellos muchos individuos humanos, aportan gran riqueza de información que conforma un nuevo marco de estudio para la biología celular y molecular y abre posibilidades desconocidas en la práctica médica. No solamente es posible obtener y analizar las secuencias de genomas completos, sino también emprender análisis a gran escala de todos los ARN y las proteínas expresados en una célula. Estos enfoques experimentales globales definen la base de la disciplina de la biología de sistemas, cuyo objetivo es la comprensión cuantitativa del comportamiento integrado de sistemas biológicos complejos. En el presente capítulo se aborda el desarrollo de estas nuevas tecnologías y su influencia en la comprensión de la biología molecular de las células.

Genomas y transcriptomas

La obtención de la secuencia completa del genoma humano fue el primer proyecto experimental a gran escala emprendido en las ciencias de la vida. Cuando se inició en los años ochenta, parecía una tarea abrumadora, que debía secuenciar completamente los tres mil millones de pares de bases del genoma humano. Al fin y al cabo, en la época la mayor molécula de ADN secuenciada era un genoma vírico de menos de 200.000 bases. El Proyecto Genoma Humano se convirtió en la principal empresa en colaboración de la biología y produjo un primer borrador de secuencias en 2001; en 2004 se publicó una secuencia completa más refinada del genoma humano. Entre tanto, se obtuvieron las secuencias completas de otras muchas especies, lo que aportó una comprensión notable de la evolución del genoma. Por otra parte, se han producido extraordinarios avances en la tecnología de secuenciación de ADN, y las nuevas metodologías permiten una secuenciación rápida y económica de genomas individuales o de ARN transcritos. Estos avances han modificado la forma en que los científicos contemplan la estructura y la función de nuestros genomas, y han permitido además nuevos planteamientos para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades basados en la secuenciación de genomas individuales.

Los genomas de las bacterias y las levaduras

La primera secuencia completa de un genoma celular, comunicada en 1995 por un equipo de investigadores dirigido por Craig Venter, correspondió a la bacteria *Haemophilus influenzae*, un habitante común de las vías respiratorias humanas. El genoma de *H. influenzae* es una molécula circular que contiene aproximadamente $1{,}8 \times 10^6$ pares de bases, más de 1.000 veces más pequeña que el genoma humano. Una vez obtenida la secuencia de ADN completa, se analizó para identificar los genes que codifican los ARNr, los ARNt y las proteínas. Las posibles regiones de codificación de proteínas fueron identificadas mediante el análisis informático de la secuencia de ADN para detectar **marcos de lectura abiertos,** largas extensiones de secuencia de nucleótidos que pueden codificar polipéptidos, dado que no contienen ninguno de los tres codones de terminación de cadena (UAA, UAG y UGA). Como estos codones de terminación de cadena aparecen de forma aleatoria una vez de cada 21 codones (tres codones de terminación de cadena en un total de 64), los marcos de lectura abiertos que se extienden más de 100 codones suelen ser representativos de genes funcionales. Este análisis obtuvo 1.743 regiones de codificación de proteínas potenciales en el genoma de *H. influenzae* junto con seis copias de ARNr y 54 genes diferentes de ARNt (**Fig. 5.1**). Las secuencias codificantes predichas tienen un tamaño medio aproximado de 900 pares de bases, con lo cual cubren en torno a 1,6 Mb de ADN, correspondiente a casi el 90% del genoma de *H. influenzae*. El genoma de *E. coli* tiene aproximadamente el doble de tamaño que el de *H. influenzae*, $4{,}6 \times 10^6$ pares de bases de longitud con unos 4.200 genes, de nuevo casi el 90% del ADN utilizado como secuencia codificante de proteínas. El uso de casi la totalidad del ADN para codificar las proteínas es típico de los genomas bacterianos, de los cuales se han generado actualmente más de 2.000.

En la levadura *Saccharomices cerevisiae* se encuentra un modelo de un genoma de eucariota sencillo, que fue secuenciado en 1996. Tal como se recoge en el Capítulo 1, las levaduras son organismos unicelulares simples, pero tienen todas las características de las células eucariotas. El genoma de *S. cerevisiae* está formado por 12×10^6 pares, que tienen un tamaño aproximado de 2,5 veces el del genoma de *E. coli*. Contiene aproximadamente 6.000 genes codificantes de proteínas. De este modo, a pesar de la mayor complejidad de una célula de eucariota, las levaduras contienen apenas un 50% más de genes que *E. coli*. Las secuencias codificadoras de proteínas suponen aproximadamente el 70% del ADN total de la levadura, con lo que, al igual que las bacterias, poseen una alta densidad de secuencia codificante de proteínas.

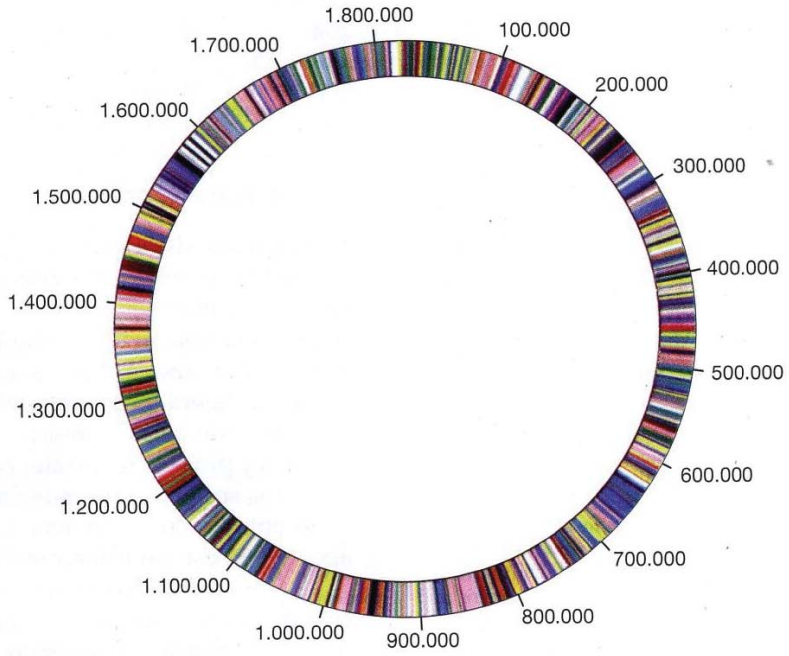


FIGURA 5.1 Genoma de *Haemophilus influenzae*. Las regiones codificadoras de proteínas predecibles se designan con las barras de colores. Los números indican pares de bases de ADN. (De R. D. Fleischmann y cols., 1995. *Science* 269: 496.)

Los genomas de Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster *y* Arabidopsis thaliana

El siguiente gran avance en genómica fue la secuenciación de los genomas de organismos multicelulares relativamente simples, *C. elegans*, *Drosophila* y *Arabidopsis*. Las características distintivas de cada

VÍDEO 5.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v5.1

Una breve introducción a *C. elegans*. *C. elegans* es un organismo modelo importante utilizado en el estudio de la biología molecular y del desarrollo.

uno de estos organismos hacen de ellos modelos interesantes para el análisis genómico: *C. elegans* y *Drosophila* se utilizan ampliamente en estudios de desarrollo animal, y *Drosophila* ha sido objeto de un análisis genético especialmente extenso. De forma similar, *Arabidopsis* es un modelo para estudios de la biología molecular y el desarrollo de las plantas. Los genomas de tres de estos organismos tienen en torno a 100×10^6 pares de bases, aproximadamente diez veces mayores que el genoma de las levaduras pero 30 veces más pequeños que el genoma humano. Las determinaciones de sus secuencias completas en 1998 *(C. elegans)* y 2000 *(Drosophila y Arabidopsis)* fueron importantes avances, que extendieron la secuenciación del genoma de las bacterias unicelulares y las levaduras a organismos multicelulares.

Un resultado imprevisto de la secuenciación de estos genomas fue que contenían menos genes codificantes de proteínas de lo esperado en relación con los genomas de bacterias y levaduras (**Tabla 5.1**). El genoma de *C. elegans* posee 97×10^6 pares de bases y contiene unas 19.000 secuencias codificantes de proteínas predichas, aproximadamente ocho veces la cantidad de ADN pero sólo tres veces el número de genes de las levaduras. Cuando en 2000 se secuenció el genoma de *Drosophila*, se encontró sorprendentemente que contiene tan sólo unos 14.000 genes codificantes de proteínas, muchos menos que el número de genes de *C. elegans*, aun cuando *Drosophila* es un organismo más complejo. Por otra parte, resulta intrigante el hecho de que un animal complejo como *Drosophila* tenga apenas algo más del doble de genes que la levadura. Las secuencias codificantes de proteínas corresponden sólo al 10%, aproximadamente, del genoma de *Drosophila* y al 25% del de *C. elegans*, en comparación con el 70% del genoma de la levadura, con lo cual los mayores tamaños de los genomas de *Drosophila* y *C. elegans* se deben sustancialmente a un aumento en la cantidad de secuencias no codificantes de proteínas, más que a genes de codificación de proteínas.

La terminación de la secuencia genómica de *Arabidopsis thaliana* en 2000 extendió la secuenciación de genomas de los animales a las plantas. El genoma de *Arabidopsis*, de aproximadamente 125×10^6 pares de bases de ADN, contiene en torno a 26.000 genes codificantes de proteínas, un número de genes significativamente superior al encontrado en *C. elegans* o en *Drosophila*. Desde entonces se han encontrado todavía más genes en otros genomas de plantas. Por ejemplo, el de la manzana contiene aproximadamente 57.000 genes codificantes de proteínas, lo que resalta la ausencia de relación entre el número de genes y la complejidad del organismo.

TABLA 5.1 Genomas representativos

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)[a]	Número de genes codificantes de proteínas	Secuencia codificada de proteínas
Bacteria			
H. influenza	1,8	1.700	90%
E. coli	4,6	4.200	88%
Levaduras			
S. cerevisiae	12	6.000	70%
Invertebrados			
C. elegans	97	19.000	25%
Drosophila	180	14.000	10%
Plantas			
Arabidopsis thaliana	125	26.000	25%
Mamíferos			
Humano	3.000	21.000	1,2%

[a] Mb = Millones de pares de base.

Genoma humano

Para muchos científicos, el objetivo final del Proyecto Genoma Humano era la determinación de la secuencia completa de nucleótidos del genoma humano: aproximadamente 3×10^9 pares de bases de ADN. Por su gran tamaño, la determinación de la secuencia del genoma humano fue un proyecto espectacular, y la publicación de su borrador en 2001 se anunció como un logro científico de magnitud histórica.

Las secuencias borrador del genoma humano publicadas en el año 2001 fueron producidas por dos grupos independientes de investigación, cada uno de los cuales adoptó un abordaje diferente. Ambas secuencias eran inicialmente borradores incompletos, en los que aproximadamente el 90% del genoma se había secuenciado y organizado. Los esfuerzos posteriores han cerrado los huecos y mejorado la precisión de las secuencias borrador, dando lugar a la publicación del International Human Genome Sequencing Consortium de una secuencia del genoma humano de alta calidad en el año 2004.

Una gran sorpresa obtenida de las secuencias genómicas fue el número inesperadamente bajo de genes humanos (Tabla 5.1). El genoma humano consiste de tan solo alrededor de 21.000 genes codificantes de proteínas que no es mucho más grande que el número de genes en animales más sencillos como *C. elegans* o *Drosophila* y menor en *Arabidopsis* o plantas. Si bien las secuencias codificantes de proteínas corresponden a la mayoría de los genomas de bacterias y levaduras y el 10%-25% de los genomas de *Drosophila* y *C. elegans*, representan tan sólo el 1% del genoma humano. La naturaleza de las secuencias adicionales en el genoma humano y su papel en la regulación génica, que puede contribuir en mayor medida a la complejidad biológica que simplemente el número de genes, se abordan en el próximo capítulo.

Más del 40% de las proteínas humanas predichas están relacionadas con proteínas de eucariotas más simples y secuenciados, como levaduras, *Drosophila* y *C. elegans*. Muchas de estas proteínas conservadas funcionan en procesos básicos celulares, como el metabolismo, la réplica de ADN y la reparación, la transcripción, la traducción, y el tráfico de proteína. La mayoría de las proteínas que son exclusivas del hombre se componen de dominios proteicos que también se encuentran en otros organismos, pero estos dominios se organizan en nuevas combinaciones para dar lugar a proteínas diferentes en humanos. Comparado con *Drosophila* y *C. elegans*, el genoma humano contiene números expandidos de genes implicados en funciones relacionadas con la mayor complejidad de los vertebrados, como la respuesta inmune, el sistema nervioso y la coagulación sanguínea, además de una elevación del número de genes implicados en el desarrollo, señalización celular y regulación de la expresión genética.

◆ El organismo conocido que contiene más genes es la manzana, que cuenta con más del doble del número de genes presentes en el genoma humano (véase Cap. 6).

◆ Durante muchos años, los científicos generalmente aceptaban una estimación de aproximadamente 100.000 genes en el genoma humano. Tras la publicación de la secuencia genómica borrador en el 2001, el número se redujo drásticamente a entre 30.000 y 40.000. Las estimaciones actuales, basadas en la secuencia de alta calidad publicada en el año 2004 y empleando herramientas informáticas mejoradas para identificar genes, reduce el número de genes humanos incluso más, hasta aproximadamente 20.000 a 25.000 (véase Cap. 6).

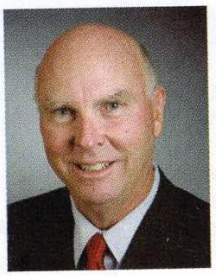
Genomas de otros vertebrados

Además del genoma humano, un gran y creciente número de genomas de vertebrados ya se han secuenciado en los últimos años, incluyendo genomas de peces, ranas, pollos, perros, roedores y primates (**Fig. 5.2**). Los genomas de estos otros vertebrados tienen un tamaño similar al del genoma humano, y contienen un número parecido de genes. Estas secuencias proporcionan comparaciones interesantes con el genoma humano y resultan de utilidad para identificar diferentes tipos de secuencias funcionales, como elementos reguladores que controlan la expresión génica. Por ejemplo, una comparación de los genomas del ser humano, el ratón, el pollo y el pez cebra indica que aproximadamente la mitad de los genes codificantes de proteínas es común a todos los vertebrados, mientras que en

EXPERIMENTO CLAVE

Genoma humano

Secuenciación inicial y análisis del genoma humano
International Human Genome Sequencing Consortium
Nature, Volumen 409, 2001, págs. 860-921
La secuencia del genoma humano
J. Craig Venter y otros 273
Science, Volumen 291, 2001, págs. 1304-1351


Craig Venter

Eric Lander

Contexto

La idea de secuenciar por completo el genoma humano fue concebida por primera vez a mediados de los años 80. Inicialmente se acogió con un amplio escepticismo entre los biólogos, la mayoría de los cuales pensaban que no era un proyecto factible. En ese momento, el genoma más grande que se había secuenciado por completo era el del virus de Epstein-Barr, que alcanzaba un total de aproximadamente 180.000 pares de bases de ADN. Desde esta perspectiva, la secuenciación del genoma, que era unas 20.000 veces más grande, parecía inconcebible para muchos. Sin embargo, la idea de un proyecto tan grande en biología captó la imaginación de otros, incluyendo a Charles DeLisi, quien estaba en ese momento al mando de la Oficina de Salud e Investigación Medioambiental en el Departamento de Energía estadounidense. En 1986, DeLisi consiguió lanzar la Iniciativa del Genoma Humano como un proyecto del Departamento de Energía.

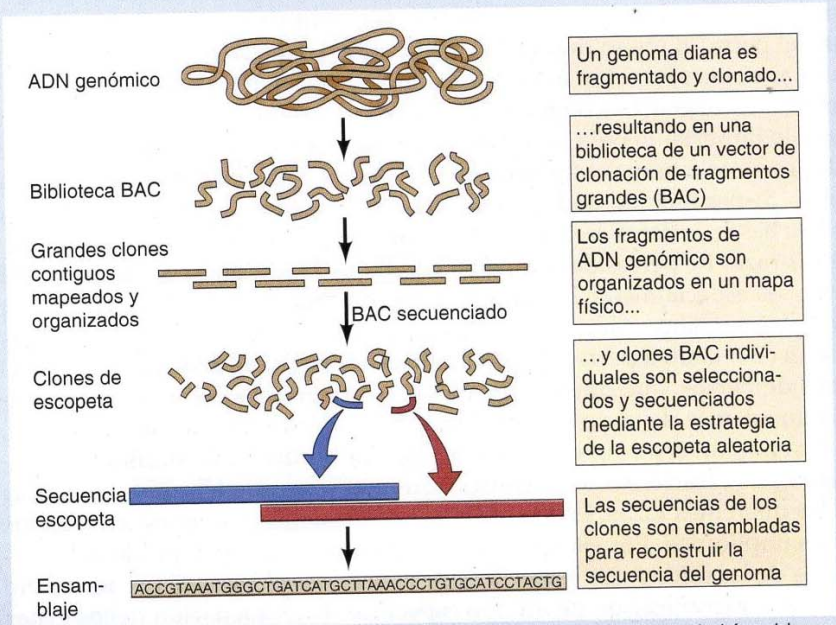
El proyecto obtuvo mayor difusión en 1988, cuando fue apoyado por un comité del Consejo Nacional de Investigación. Este comité recomendaba un mayor esfuerzo, incluyendo la secuenciación de genomas de varios organismos modelo y el desarrollo paralelo de mapas genéticos y físicos de los cromosomas humanos. Este esfuerzo se centró en los Institutos Nacionales de Salud, inicialmente bajo la dirección de James Watson (codescubridor de la estructura del ADN), y después bajo el liderazgo de Frances Collins.

El primer genoma completo que se secuenció fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae*, reportado por Craig Venter y sus colaboradores en 1995. Venter había formado parte del proyecto de secuenciación genómica en los Institutos Nacionales de Salud, pero había pasado a dirigir una compañía sin ánimo de lucro, el Instituto para la Investigación Genómica, en 1991. Durante este tiempo, se había conseguido un progreso considerable en el mapeo del genoma humano, y la secuencia inicial de *H. influenzae* fue seguida de las secuencias de otras bacterias, levadura y *C. elegans* en 1998.

En 1998, Venter formó una nueva compañía, Celera Genomics, y anunció sus planes de emplear tecnologías avanzadas de secuenciación para obtener la secuencia completa del genoma humano en 3 años. Collins y otros líderes del Proyecto Genoma financiados con fondos públicos respondieron acelerando sus esfuerzos, resultando en una carrera que finalmente dio lugar a la publicación de dos secuencias borrador del genoma humano en febrero de 2001.

Experimentos

Los dos grupos de científicos emplearon métodos diferentes para obtener la secuencia del genoma humano. El equipo financiado con fondos públicos, el International Human Genome Sequencing



Estrategia para la secuenciación genómica mediante clones de BAC que habían sido organizados en grupos solapantes (contiguos) y mapeados a cromosomas humanos.

EXPERIMENTO CLAVE

Consortium, encabezado por Eric Lander, secuenció fragmentos de ADN derivados de clones cromosoma artificial bacteriano (BAC) que habían sido previamente apeados a cromosomas humanos, de forma similar al método empleado para determinar la secuencia de los genomas de levadura y *C. elegans* (véase figura). Por el contrario, el equipo de Celera Genomics empleó un método de secuenciación de escopeta con el genoma completo, que Venter y sus colaboradores habían empleado previamente para secuenciar el genoma de *H. influenzae*. En este método, los fragmentos de ADN se secuencian aleatoriamente, y se emplearon repeticiones entre fragmentos para recomponer una secuencia del genoma completo. Ambas secuencias cubren sólo la porción de eucromatina del genoma humano —aproximadamente 2.900 millones de pares de bases (Mb) de ADN— con la porción rica en repeticiones de la heterocromatina del genoma (aproximadamente 300 Mb) permaneciendo sin secuenciar.

Ambas de estas versiones inicialmente publicadas eran borradores, en lugar de secuencias completas. Esfuerzos posteriores completaron la secuencia, dando lugar a la publicación de una secuencia altamente precisa de la secuencia del genoma humano en el año 2004.

Impacto

Inmediatamente surgieron muchas conclusiones importantes a partir de las secuencias del genoma humano.

De forma asombrosa, el número de genes humanos resultó sorprendentemente bajo, de apenas entre 20.000 y 25.000 en la secuencia completa. Este inesperado resultado ha llevado a reconocer el papel de las secuencias codificantes no proteínicas de nuestro genoma, sobre todo en lo que respecta a los múltiples mecanismos por los cuales se regula la expresión génica.

Más allá de las conclusiones inmediatas extraídas en 2004, la secuencia del genoma humano, junto con las secuencias genómicas de otros organismos, ha proporcionado una nueva base para la biología y la medicina. El impacto de la secuencia del genoma ha sido fundamental, y aún se percibe así, para descubrir nuevos genes y sus funciones, comprender la regulación génica, determinar la base de las enfermedades humanas y desarrollar nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento a partir de la dotación genética de cada individuo. El conocimiento del genoma humano puede contribuir en última instancia a alcanzar lo que Venter y sus colegas denominan «el verdadero reto de la biología humana... explicar suficientemente bien el modo en que nuestras mentes llegan a organizar los pensamientos para investigar nuestra propia existencia».

torno a 3.000 genes son únicos para cada una de estas cuatro especies (**Fig. 5.3**).

Los genomas de mamíferos que han sido secuenciados, además del genoma humano, incluyen los genomas del ornitorrinco, la comadreja , la rata, el perro, el mono rhesus y el chimpancé. Como se ha descrito en capítulos anteriores, el ratón es el sistema modelo clave para los estudios experimentales de genética de mamíferos y su desarrollo, mientras la rata es un modelo importante para los estudios de fisiología humana y medicina. Los ratones, ratas y humanos poseen un 90% de sus genes en común, de manera que la disponibilidad de las secuencias de los genomas de ratón y de rata aporta bases de datos esenciales para la investigación en este campo. Las diversas razas de perros de compañía hacen que la secuencia del genoma del perro sea especialmente importante para comprender la base genética de la morfología, comportamiento y una diversidad de enfermedades complejas que afectan tanto a perros como a humanos. Existen aproximadamente 300 razas de perros, que difieren en sus características físicas y de comportamiento además de en su susceptibilidad a una variedad de enfermedades, incluyendo diversos tipos de cáncer, ceguera, sordera y trastornos metabólicos. Estas características se consideran unas propiedades muy específicas de las diferentes razas, lo que facilita enormemente la identificación de los genes implicados. Por ejemplo, como comentamos en el Capítulo 6, los estudios de las diferencias específicas de raza de las piernas de los perros dio lugar a la identificación de un tipo específico de reordenación de los genes responsables de esta característica. Análisis recientes de genomas caninos también han identificado los genes responsables del color del pelaje y el tamaño corporal de las razas pequeñas. Se están realizando análisis similares

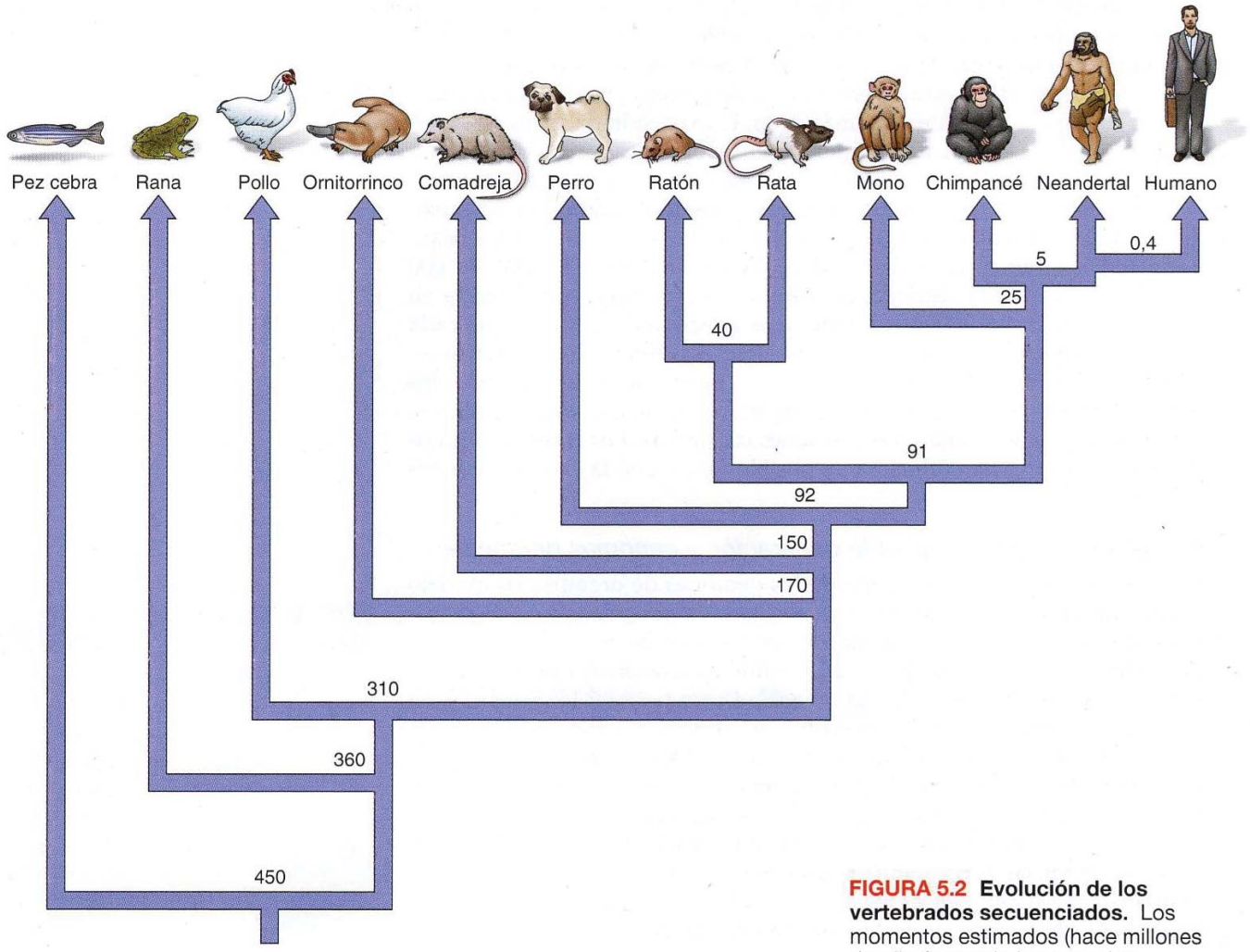


FIGURA 5.2 Evolución de los vertebrados secuenciados. Los momentos estimados (hace millones de años) cuando las especies divergieron están indicados como puntos de ramificación en el diagrama.

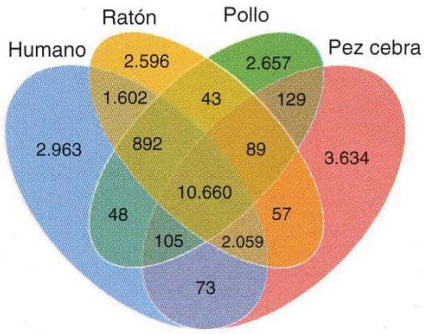


FIGURA 5.3 Comparación de genomas de vertebrados. Se indica el número de genes compartidos entre el ser humano, el ratón, el pollo y el pez cebra. (De K. Howe y cols., 2013. *Nature* 496: 498.)

para conocer la base genética de múltiples enfermedades, como ciertos tipos de cáncer, frecuentes en algunas razas de perros. Puesto que muchas de estas enfermedades afectan a perros y personas, es de esperar que los resultados de dichos estudios influyan en la salud humana además de en la medicina veterinaria. También podemos anticipar análisis genéticos del comportamiento canino en el futuro. Puesto que muchas conductas de los perros, como ansiedad de separación, también son frecuentes en las personas, los psicólogos tendrán mucho que aprender de la especie que ha sido nuestra compañera más íntima durante miles de años.

Las secuencias de los genomas de otros primates, incluidos chimpancés, bonobos, orangutanes y macacos rhesus, podrían ayudar a precisar las características exclusivas de nuestro genoma que nos diferencian de otros primates. Curiosamente, sin embargo, la comparación de estas secuencias indica que la respuesta a la pregunta de qué nos hace humanos no es sencilla. La secuencia de los genomas de humanos y chimpancés es aproximadamente un 99% idéntica. Quizá, sorprendentemente, las diferencias entre las

secuencias de humanos y chimpancés frecuentemente alteran las secuencias codificantes de los genes, dando lugar a cambios en las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las proteínas. A pesar de que muchos de estos cambios aminoacídicos no afecten a la función proteica, parece que hay modificaciones en la estructura además de en la expresión de miles de genes entre chimpancés y humanos, de modo que la identificación de dichas diferencias que es la clave al origen del ser humano no será una tarea sencilla.

El genoma de los neandertales, nuestros parientes evolutivos más próximos, también ha sido secuenciado recientemente. Se calcula que los neandertales y los humanos modernos divergieron hace unos 300.000-400.000 años. Los genomas de neandertales y humanos modernos son idénticos en un 99,9%, aproximadamente, mucho más relacionados entre sí que cada uno de ellos con el chimpancé. Curiosamente, esas diferencias alteran la secuencia codificadora de solo unos 90 genes que están conservados en los humanos modernos. Estos son genes implicados en la piel, el desarrollo esquelético, el metabolismo y las funciones cognitivas. Los futuros estudios de estos genes podrían dilucidar su posible función en la evolución de los humanos modernos.

Secuenciación de la siguiente generación y genomas personales

El genoma humano y la mayoría de los genomas de organismos modelo analizados anteriormente fueron secuenciados con la técnica de didesoxinucleótidos expuesta en el Capítulo 4, que fue descrita por primera vez por Fred Sanger en 1977 (véase Fig. 4.20). La automatización de este método básico incrementó su velocidad y su capacidad para permitir la secuenciación del genoma completo y culminó con la terminación con éxito de una secuencia del genoma humano de alta calidad en 2004. Sin embargo, aun con una automatización robusta, la secuenciación del genoma mediante este enfoque resultaba lenta y costosa, con lo cual secuenciar un genoma completo se convertía en una empresa de notable envergadura. Por ejemplo, la secuenciación inicial del genoma humano llevó 15 años y tuvo un coste aproximado de 3.000 millones de dólares. Iniciada en 2005, desarrolló una serie de métodos de secuenciación, denominados conjuntamente **secuenciación**

ANIMACIÓN 5.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a5.1

Secuenciación de la siguiente generación. En la secuenciación de ADN de la siguiente generación se secuencian simultáneamente millones de moldes, lo que incrementa de forma espectacular la velocidad de secuenciación.

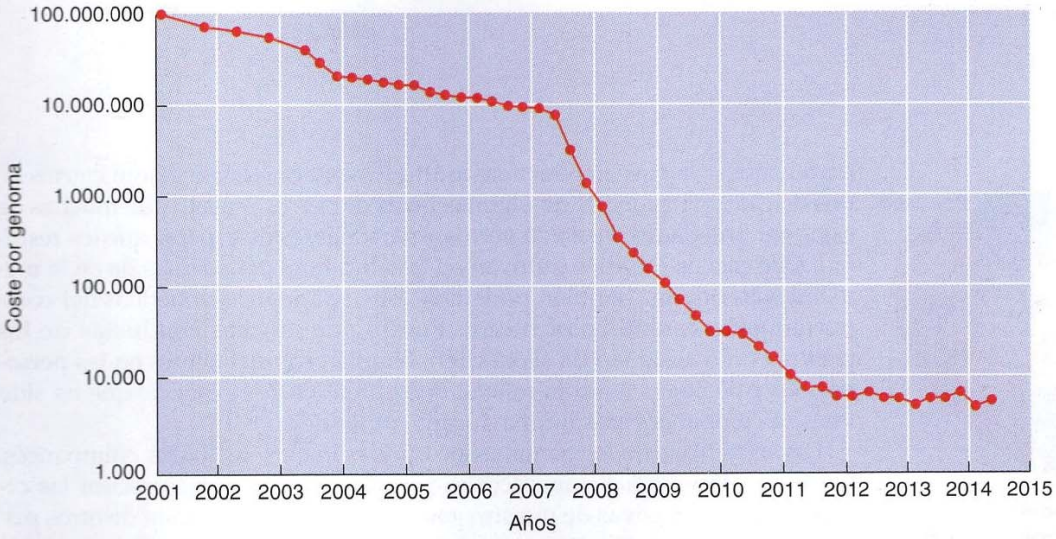


FIGURA 5.4 Avances en la secuenciación de ADN. El coste de la secuenciación de un genoma humano ha descendido desde aproximadamente 100 millones de dólares en 2001 a unos miles en 2015. (Datos del National Human Genome Research Institute).

de la siguiente generación, que lograron aumentar la velocidad y redujeron el coste de la secuenciación de genomas (**Fig. 5.4**). Desde 2001, el coste de la secuenciación de un genoma humano se ha reducido más de 10.000 veces, desde aproximadamente 100 millones de dólares a varios miles. La velocidad de secuenciación ha aumentado más todavía, con lo que hoy es posible secuenciar un genoma humano completo en unos días. Estos cambios espectaculares en la tecnología de secuenciación han abierto la puerta a la secuenciación de genomas completos de un gran número de diferentes individuos, lo que ha dado origen a enfoques novedosos para comprender la base genética de muchas de las enfermedades que afligen a la humanidad, entre ellas el cáncer, las cardiopatías y las enfermedades degenerativas del sistema nervioso, como las de Parkinson y Alzheimer. Además, comprender nuestra singular configuración genética como individuos llevará, según se espera, a desarrollar nuevas estrategias individualizadas para la prevención y el tratamiento de las enfermedades.

La secuenciación de ADN de la siguiente generación (también denominada secuenciación masivamente en paralelo) engloba los diversos métodos en los que se secuencian simultáneamente varios millones de moldes en una sola reacción. La estrategia general básica de estos métodos se ilustra en la **Figura 5.5**. En primer lugar, se fragmenta el ADN y se añaden secuencias de adaptador, que actúan como cebadores de las reacciones de amplificación y secuenciación a los extremos de cada fragmento. Seguidamente se unen moléculas de ADN individuales a una superficie sólida y se amplifican por PCR para producir grupos de moldes separados espacialmente. Es posible secuenciar millones de partículas en paralelo con el uso de láseres para vigilar la incorporación de nucleótidos fluorescentes. Las secuencias obtenidas de esta gran colección de fragmentos superpuestos pueden reunirse a continuación para producir una secuencia de genoma continua. Alternativamente, si ya se dispone de una secuencia de genoma (por ejemplo, el genoma humano), puede utilizarse como genoma de referencia en torno al cual alinear las secuencias de fragmentos de un individuo en particular.

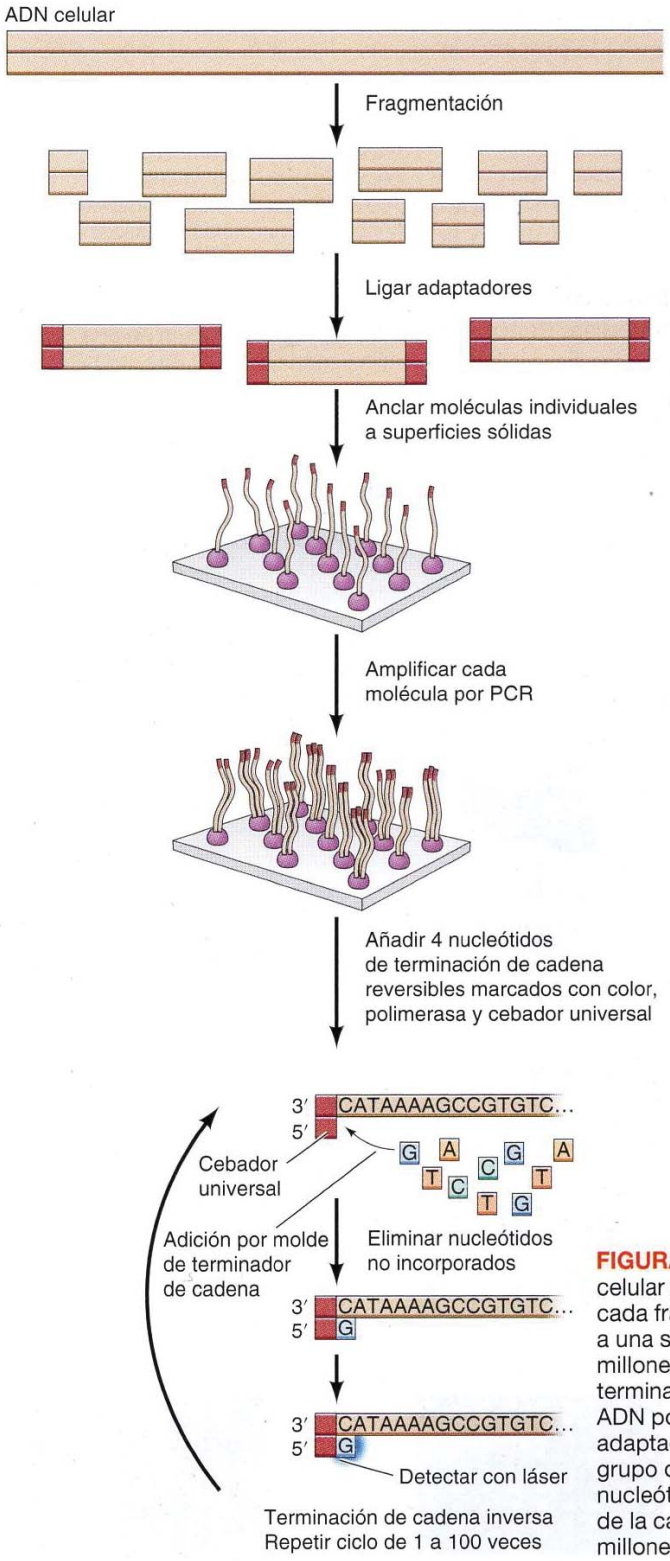


FIGURA 5.5 Secuenciación de la siguiente generación. El ADN celular se fragmenta y se ligan adaptadores a los extremos de cada fragmento. Las moléculas individuales se fijan seguidamente a una superficie sólida y se amplifican por PCR, para formar millones de grupos de moléculas. Se añaden cuatro nucleótidos de terminación de cadena reversibles marcados por color junto con la ADN polimerasa y un cebador que reconoce la secuencia de adaptadores. La incorporación de un nucleótido marcado en cada grupo de moléculas de ADN es detectada por láser. Los nucleótidos no incorporados se eliminan, se invierte la terminación de la cadena y se repite el ciclo para obtener las secuencias de millones de grupos simultáneamente.

Entre los primeros genomas humanos individuales que se secuenciaron se incluyeron los de Craig Venter y James Watson, comunicados en 2007 y 2008. Desde entonces se han determinado los genomas de miles de personas. Con el coste de la secuenciación de un genoma individual situado hoy en día en términos de unos miles de dólares, puede preverse que la secuenciación de genomas personales se convertirá en parte de la práctica médica habitual. Esto permitirá diseñar terapias adaptadas específicamente a las necesidades de pacientes individuales, con respecto tanto a la prevención como al tratamiento de las enfermedades. Tal vez el ejemplo más actual, analizado en el Capítulo 19, sea el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer, que están dirigidos específicamente contra mutaciones que pueden identificarse por secuenciación de los genomas cancerígenos de pacientes individuales. En el futuro cabe esperar que la secuenciación del genoma de personas sanas tenga un papel importante en la prevención de enfermedades al identificar los genes que confieren susceptibilidad a las mismas, seguido por la adopción de medidas adecuadas de intervención. Por ejemplo, la secuenciación de genomas podría identificar mujeres portadoras de mutaciones en genes que confieren un riesgo elevado de desarrollo de cáncer de mama que pudiera ser prevenido mediante una mastectomía. Casi nadie duda de que el continuo avance de la genómica no sólo llevará a un incremento de las aplicaciones en medicina, sino que además nos ayudará a determinar la contribución de nuestros genes a otras características singulares, como el rendimiento deportivo o la inteligencia, y a comprender mejor las interacciones entre los genes y el ambiente que conducen a la complejidad del comportamiento humano.

Análisis global de la expresión génica

La disponibilidad de secuencias de genomas completos ha permitido a los investigadores estudiar la expresión génica en un nivel global extendido a todo el genoma. Así pues, actualmente es posible analizar todos los ARN que se transcriben en una célula (**transcriptoma**), en lugar de analizar la expresión de cada gen por separado. Un método de uso frecuente para el análisis de expresión global es la hibridación de **micromatrices de ADN**, que permite analizar simultáneamente la expresión de decenas de miles de genes. Una micromatriz de ADN consiste en un chip de vidrio o de silicio en el cual se imprimen oligonucleótidos por medio de un sistema robótico en pequeños puntos con alta densidad (**Fig. 5.6**). Cada punto de la matriz está formado por un único oligonucleótido. En un chip típico es posible imprimir decenas de miles de sondas individuales, con lo que se facilita la producción de micromatrices de ADN que contienen secuencias representativas de todos los genes de los genomas celulares. Tal como se ilustra en la Figura 5.6, una aplicación extendida de las micromatrices de ADN tiene lugar en estudios de expresión génica; por ejemplo, una comparación de los genes expresados por dos tipos de células diferentes. En un experimento de esta clase, las sondas de ADNc se sintetizan a partir de los ARNm expresados en cada uno de los dos tipos celulares (p. ej., células cancerígenas y células normales) por transcripción inversa. Los ADNc son marcados con colorantes

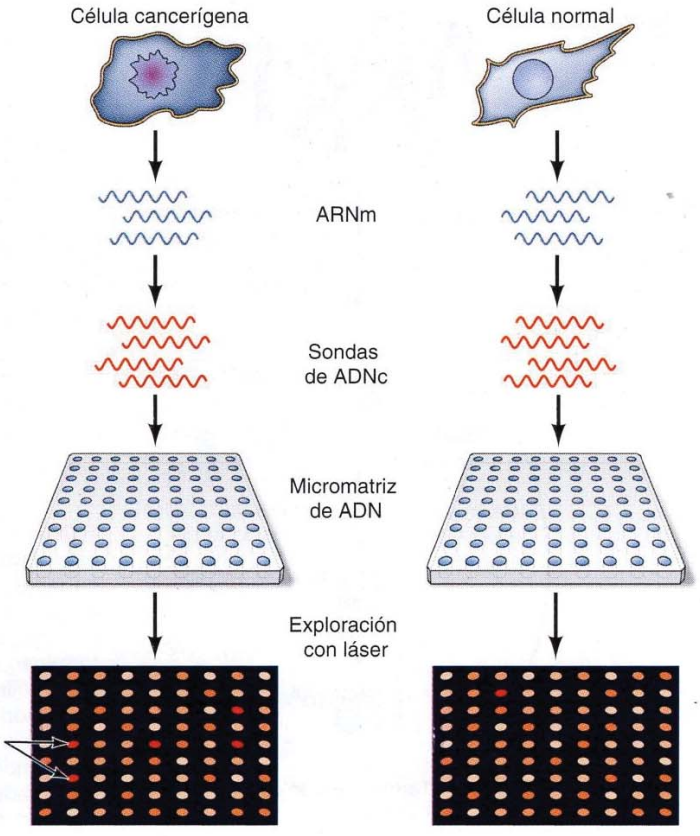


FIGURA 5.6 Micromatrices de ADN. Ejemplo de análisis comparativo de la expresión génica en células cancerígenas y normales. Se extrae ARNm de las células cancerígenas, y las células normales se utilizan como moldes para la síntesis de sondas de ADNc marcadas con un colorante fluorescente. Las sondas de ADNc se hibridan a continuación en una micromatriz de ADN que contiene puntos de oligonucleótidos correspondientes a 20.000 genes humanos distintos o más. El nivel relativo de expresión de cada gen está indicado por la intensidad de fluorescencia en cada posición en la micromatriz, y es posible comparar los niveles de expresión en las células cancerígenas y normales. Los ejemplos de genes expresados en los niveles superiores de células cancerígenas se indican mediante flechas.

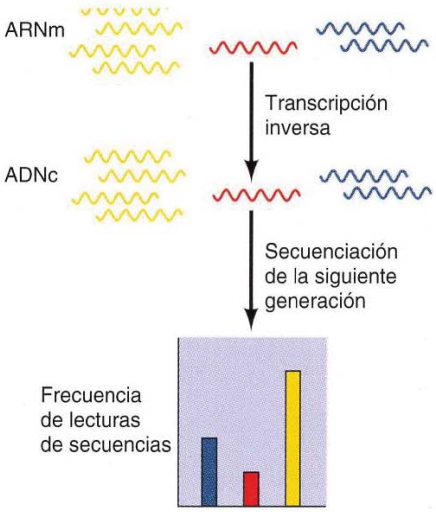


FIGURA 5.7 ARN-seq. El ARNm celular se somete a transcripción inversa para convertirse en ADNc, al que se le aplica una secuenciación de generación de la siguiente generación. Los resultados producen las secuencias de todos los ARNm en una célula. La cantidad relativa de cada ARNm está indicada por la frecuencia a la que se representa su secuencia en el número total de secuencias leídas.

ANIMACIÓN 5.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a5.2

Tecnología de micromatrices de ADN. Las micromatrices de ADN permiten analizar simultáneamente la expresión de decenas de miles de genes.

fluorescentes y se hibridan en micromatrices de ADN en las que están representados 20.000 o más genes humanos por puntos de oligonucleótidos. A continuación se analizan las matrices con un explorador láser de alta resolución, y la extensión relativa de la transcripción de cada gen se indica mediante la intensidad de fluorescencia en el punto apropiado de la matriz. Entonces es posible analizar los niveles relativos de expresión génica entre las células cancerígenas y las células normales mediante la comparación de la intensidad de hibridación de sus ADNc con los oligonucleótidos que representan cada uno de los genes de la célula.

El continuo desarrollo de la secuenciación de la siguiente generación también ha hecho viable el uso de secuenciación de ADN para determinar y cuantificar todos los ARN expresados en una célula. En este enfoque, denominado **ARN-seq**, se aíslan ARNm de las células, se convierten en ADNc por transcripción inversa y se someten a secuenciación de la siguiente generación (**Fig. 5.7**). A diferencia del análisis de micromatrices, ARN-seq revela la extensión completa de las secuencias transcritas en una célula, en lugar de simplemente detectar aquellas que se hibridan en una sonda en una micromatriz. La frecuencia con la que se detectan las secuencias individuales en ARN-seq es proporcional a la cantidad de ARN en la célula, con lo que este análisis determina tanto la abundancia como la identidad de todas las secuencias transcritas. La sensibilidad de ARN-seq es suficientemente elevada para permitir el análisis de células individuales, con lo cual es posible determinar los transcriptomas de células individuales.

Una de las sorpresas reveladas por el análisis ARN-seq ha sido el hecho de que se transcriben muchos más ARN que los considerados por los genes codificantes de proteínas de las células humanas. Como se aborda en el capítulo siguiente, estos estudios han llevado a la identificación de nuevas clases de ARN que desempeñan papeles fundamentales en la regulación génica.

Proteómica

El análisis de los genomas y los transcriptomas de las células constituye únicamente una etapa primera en la comprensión del funcionamiento de una célula. Dado que las proteínas son responsables directamente de llevar a cabo la mayor parte de las actividades celulares, es necesario comprender no sólo qué proteínas pueden ser codificadas por el genoma de una célula sino también cuáles son las que se expresan realmente y cómo funcionan dentro de la célula. Por lo tanto, para comprender de forma completa la función celular es necesario no sólo el análisis de la secuencia y la transcripción de su genoma, sino también un estudio sistemático de su complemento proteínico. Este análisis a gran escala de las proteínas de las células (**proteómica**) tiene como objetivo identificar y cuantificar todas las proteínas expresadas en una célula dada (el **proteoma**), así como establecer la posición de estas proteínas en los diferentes orgánulos subcelulares y elucidar las redes de interacciones entre las proteínas que rigen las actividades de las células.

Identificación de las proteínas de la célula

El número de distintas especies de proteínas en las células eucariotas suele ser mucho mayor que el número de genes. Este hecho se produce porque muchos genes pueden expresarse para producir varios ARNm distintos, que codifican diferentes polipéptidos como consecuencia de *splicing* alternativo (abordado en el Capítulo 6). Además, las proteínas pueden modificarse de distintas formas, como es la adición de grupos fosfato, carbohidratos y moléculas lipídicas. El genoma humano comprende, por ejemplo, 20.000 genes codificantes de proteínas diferentes, y el número de estos ge-

nes expresado en una célula dada se sitúa, según se cree, en alrededor de 10.000. Sin embargo, debido a las modificaciones de proteínas y al *splicing* alternativo, se estima que estos genes pueden dar lugar a más de 100.000 proteínas diferentes. Además, estas proteínas pueden expresarse en una amplia diversidad de niveles. La caracterización del complemento proteínico completo de una célula, que es el objetivo de la proteómica, representa así un reto considerable. Aunque se han realizado avances importantes en los últimos años, aún quedan obstáculos tecnológicos sustanciales que es preciso superar antes de conseguir una caracterización completa de los proteomas de las células.

La primera tecnología desarrollada para la separación a gran escala de las proteínas celulares fue la **electroforesis en gel bidimensional** (**Fig. 5.8**). Primero, se somete a electroforesis una mezcla de proteínas celulares en un tubo con un gradiente de pH de extremo a extremo. Cada proteína migra de acuerdo con la carga hasta que alcanza un pH para el cual se neutraliza la carga de dicha proteína, determinado de acuerdo con el contenido de aminoácidos ácidos y básicos en la misma. Después de desnaturalización y unión a SDS, las proteínas se someten a electroforesis en una segunda dimensión, en condiciones en las cuales se separan según su tamaño, de manera que las proteínas de bajo peso molecular se mueven con más rapidez a través del gel. Este enfoque es capaz de resolver varios miles de especies de proteínas a partir de un extracto celular. Sin embargo, esta cifra es muy inferior al número total de proteínas expresado en las células de mamíferos, y es importante observar que la electroforesis en gel bidimensional presenta un sesgo hacia la detección de las proteínas celulares más abundantes.

La principal herramienta utilizada actualmente en proteómica es la **espectrometría de masas**, que fue desarrollada en los años noventa como un poderoso método de identificación de proteínas (**Fig. 5.9**). Las proteínas que

◆ La espectrometría de masas tiene muchos usos, entre ellos los análisis de muestras de sangre de los deportistas para detectar la presencia de determinadas sustancias que mejoran el rendimiento.

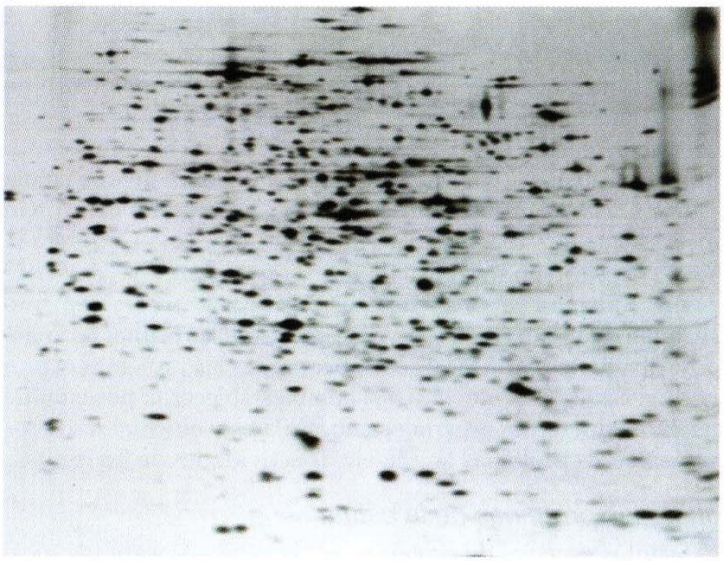


FIGURA 5.8 Electroforesis en gel bidimensional. Primero se somete a electroforesis una mezcla de proteínas celulares en un gradiente de pH de manera que se separan de acuerdo con su carga (eje horizontal). Después, las proteínas son sometidas a otra electroforesis en una segunda dimensión en condiciones en las que se separan por tamaño (eje vertical). El gel se tiñe para revelar puntos correspondientes a las distintas especies de proteínas. El ejemplo mostrado es un gel de proteínas de *E. coli.* (De P. H. O'Farrell, 1975, *J. Biol. Chem.* 250: 4007; cortesía de Patrick H. O'Farrell).

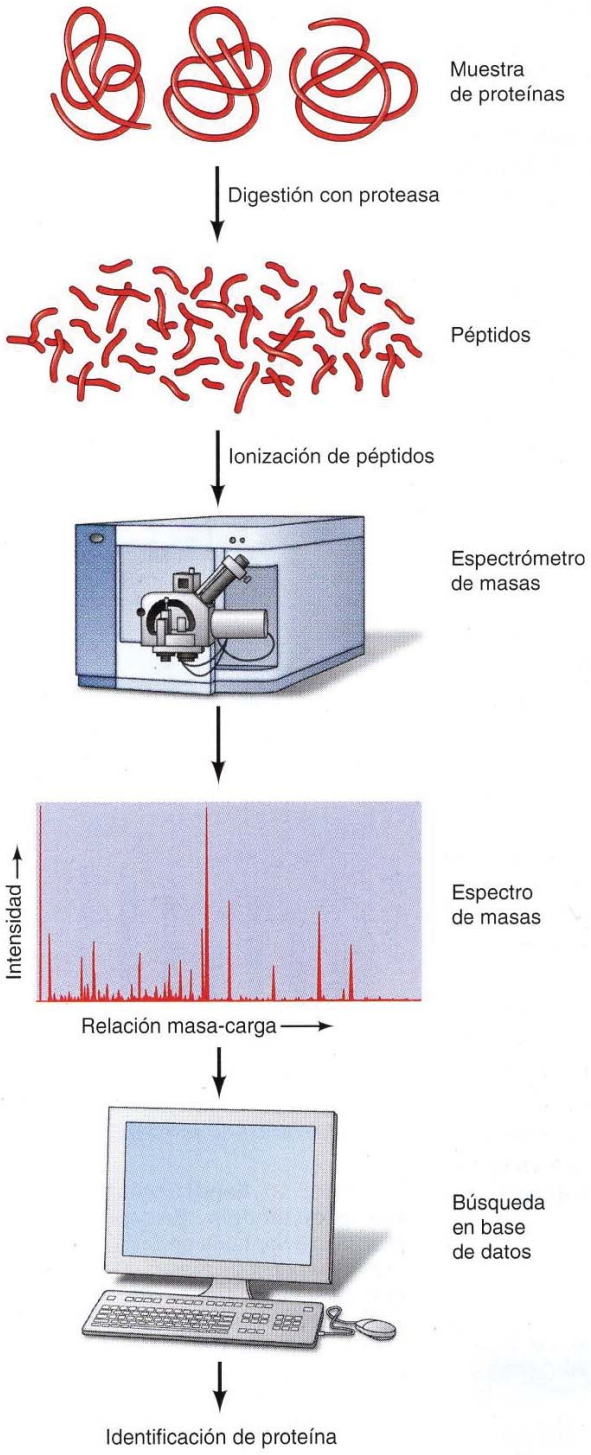


FIGURA 5.9 Identificación de proteínas por espectrometría de masas. Se digiere una proteína con una proteasa que la escinde en péptidos pequeños. Seguidamente se ionizan los péptidos y se analizan en un espectrómetro de masas, que determina la relación masa-carga de cada péptido. Los resultados se muestran en forma de un espectro de masas, que se compara con una base de datos de espectros de masas teóricos de todas las proteínas conocidas, con el fin de identificar la proteína.

se analizarán, que podrían obtenerse a partir de geles bidimensionales, son digeridas con una proteasa para escindir las proteínas en pequeños fragmentos (péptidos) en el intervalo de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de longitud. Una proteasa utilizada de forma habitual es la tripsina, que escinde las proteínas en el lado del extremo carboxilo de los residuos de lisina y arginina. Los péptidos son ionizados seguidamente por irradiación con láser o mediante el paso a través de un campo de alto potencial eléctrico y se introducen en un espectrómetro de masas, que mide la relación masa-carga de cada péptido. Así se genera un espectro de masas en el cual los péptidos tríptico individuales se indican por un máximo que corresponde a su relación masa-carga. Es posible utilizar algoritmos informáticos para comparar el espectro de masas determinado experimentalmente con una base de datos de espectros de masa teóricos que representan los péptidos tríptico de todas las proteínas conocidas, lo que permite la identificación de la proteína desconocida.

Puede obtenerse una información más detallada de las secuencias que la que aporta la masa de los péptidos si se utiliza **espectrometría de masas en tándem** (**Fig. 5.10**). En esta técnica, los péptidos individuales del espectro de masas inicial se seleccionan automáticamente para su entrada en una «célula de colisión», en la que son degradados parcialmente por rotura aleatoria de los enlaces peptídicos. Se determina así un segundo espectro de masas de los productos de degradación parcial de cada péptido. Dado que cada aminoácido posee un peso molecular propio, la secuencia de aminoácidos del péptido puede deducirse a partir de estos datos. Las modificaciones de proteínas, como, por ejemplo, la fosforilación, también pueden identificarse, dado que alteran la masa del aminoácido modificado.

Aunque poderoso, el enfoque formado por gel bidimensional y espectrometría de masas presenta limitaciones. Como se ha indicado anteriormente, los geles bidimensionales favorecen la detección de las proteínas celulares más abundantes, y las proteínas de membrana son característicamente difíciles de resolver mediante este planteamiento. Dadas estas limitaciones, parece que los geles bidimensionales son capaces de resolver proteínas correspondientes a sólo unos centenares de genes, lo que representa una pequeña fracción de todas las proteínas de las células. Un enfoque alternativo consiste en el uso de espectrometría de

masas para analizar las mezclas de proteínas, con lo que se elimina la separación inicial de proteínas por electroforesis en gel bidimensional. En este acercamiento, denominado «espectrometría de masas *shotgun*», una mezcla de proteínas celulares es digerida por la proteasa (por ejemplo, tripsina), y la mezcla compleja de péptidos se somete a secuenciación por espectrometría de masas en tándem. A continuación se utilizan las secuencias de péptidos individuales para una búsqueda en bases de datos con el fin de identificar las proteínas presentes en la mezcla de inicio. Se han desarrollado métodos adicionales para comparar las cantidades de proteínas en dos muestras diferentes, lo que permite un análisis cuantitativo de los niveles de proteínas en distintos tipos de células o en células que se han sometido a tratamientos diferentes. Aunque quedan sin resolver varios problemas relativos a la sensibilidad y la precisión de estos métodos, el análisis de mezclas complejas de proteínas por espectrometría de masas por método «*shotgun*» ofrece un enfoque poderoso para el análisis sistemático de las proteínas de las células.

Análisis global de localización de proteínas

La comprensión de la función de las células eucariotas requiere no sólo la identificación de las proteínas expresadas en un tipo de células dado, sino además la caracterización de las posiciones de dichas proteínas en una célula. Como se analizó en el Capítulo 1, las células eucariotas contienen un núcleo y diversos orgánulos subcelulares. El análisis sistemático de las proteínas presentes en estos orgánulos es un objetivo importante de los enfoques proteómicos de la biología celular.

La composición de proteínas de una diversidad de orgánulos ha sido determinada por la combinación de métodos clásicos de la biología celular con la espectrometría de masas. Los orgánulos de interés se aíslan a partir de las células por técnicas de fraccionamiento subcelular, tal como se expone en el Capítulo 1 (véanse Figs. 1.39 y 1.40). Las proteínas presentes en orgánulos aislados pueden determinarse a continuación mediante espectrometría de masas. El proteoma de una diversidad de orgánulos y grandes estructuras subcelulares, como los nucléolos, se ha caracterizado mediante este enfoque; en la **Tabla 5.2** se ilustran algunos ejemplos. Así, se han identificado más de 700 proteínas diferentes por espectrometría de masas de mitocondrias aisladas y aproximadamente 200 proteínas diferentes identificadas en lisosomas. En la realización de estos estudios con orgánulos aislados de células de diferentes tejidos o cultivados en distintas condiciones es posible también determinar los cambios en la composición de proteínas que se asocian a diversos tipos celulares o estados fisiológicos.

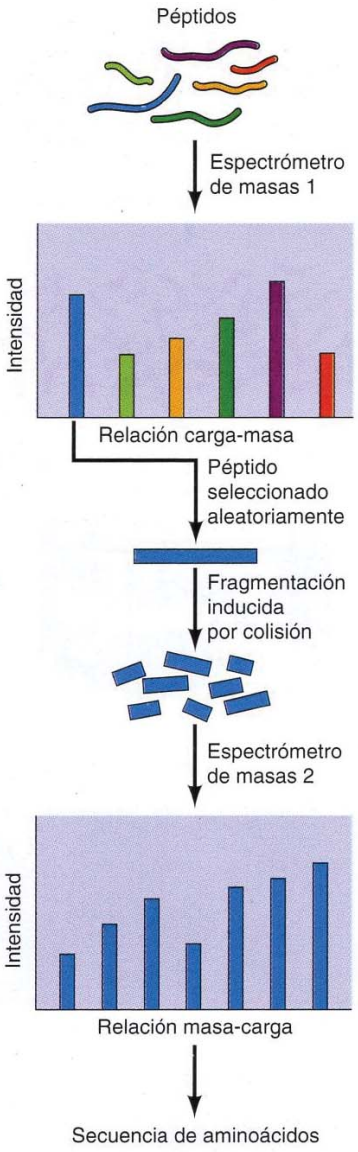


FIGURA 5.10 Espectrometría de masas en tándem. Se separa una mezcla de péptidos en un espectrómetro de masas 1. A continuación se fragmenta un péptido seleccionado aleatoriamente por una ruptura inducida por colisión de enlaces peptídicos. Los fragmentos, que difieren en aminoácidos individuales, son separados a continuación en un segundo espectrómetro de masas 2. Dado que los fragmentos difieren en aminoácidos individuales, es posible deducir la secuencia de aminoácidos del péptido.

TABLA 5.2 Composición de proteínas de estructuras celulares

Estructura	Número de proteínas identificadas[a]
Membrana plásmica	860–2000
Retículo endoplásmico	140
Mitocondrias	400–750
Lisosoma	200
Centrosoma	114
Peroxisoma	70
Aparato de Golgi	400

[a] Rango de los números de identificación de proteínas que representan los resultados obtenidos en diferentes tipos de células.
Fuente: Datos de J. R. Yates III *et al.*, 2005. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 702.

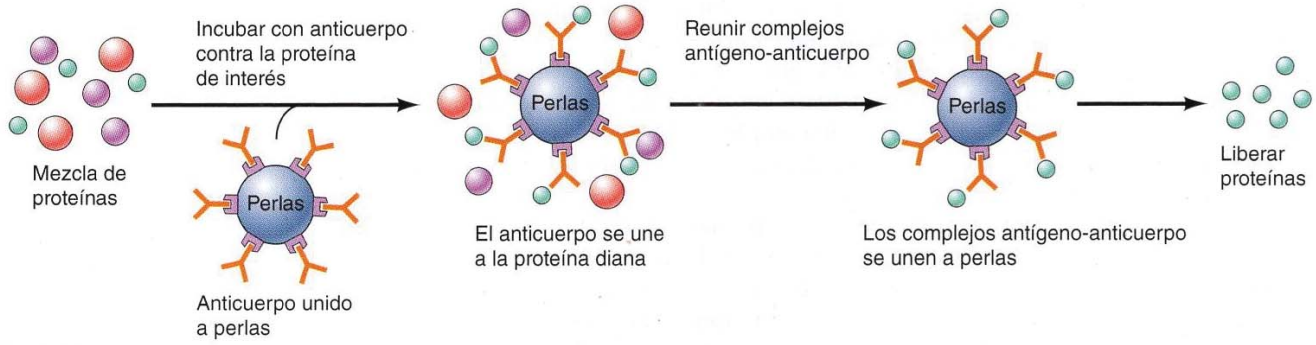


FIGURA 5.11 Inmunoprecipitación. Se incuba una mezcla de proteínas celulares con un anticuerpo unido a perlas. El anticuerpo forma complejos con la proteína (verde) contra la cual se dirige (el antígeno). Estos complejos antígeno-anticuerpo se reúnen en las perlas y se aísla la proteína diana.

Interacciones entre proteínas

Las proteínas no actúan casi nunca en solitario dentro de la célula. Al contrario, en general funcionan en interacción con otras proteínas en complejos y redes. La determinación de las interacciones entre las proteínas proporciona así claves importantes sobre el funcionamiento de las nuevas proteínas, además de ayudar a comprender las complejas redes de interacciones que rigen el comportamiento de la célula. Junto con estudios globales de localización subcelular, el análisis sistemático de los complejos de proteínas y sus interacciones se ha convertido, de este modo, en un objetivo importante de la proteómica.

Un enfoque del análisis de los complejos de proteínas consiste en aislar una proteína de las células en condiciones suaves, de manera que permanezca asociada a las proteínas con las que interacciona normalmente dentro de la célula. Por lo general, se utilizaría un anticuerpo contra una proteína de interés para aislar esa proteína de un extracto celular por **inmunoprecipitación** (**Fig. 5.11**). Se incuba un extracto celular con un anticuerpo, que se une a su proteína diana antigénica. Así, pueden aislarse los complejos antígeno-anticuerpo resultantes. Si el extracto celular se ha preparado en condiciones suaves, de manera que la proteína diana permanezca asociada con las proteínas con las que interacciona normalmente dentro de la célula, estas proteínas de interacción estarán presentes en los inmunoprecipitados. Dichos complejos de proteínas inmunoprecipitados pueden analizarse, por ejemplo mediante espectrometría de masas, para identificar no sólo la proteína contra la que se dirigió el anticuerpo, sino también otras proteínas con las que estaba asociada en el extracto celular (**Fig. 5.12**). Este planteamiento de análisis de las interacciones de las proteínas se ha utilizado para caracterizar diversas interacciones proteína-proteína en diferentes tipos de células y en distintas condiciones fisiológicas, para llevar a la identificación de numerosas interacciones entre proteínas que intervienen en procesos como la señalización celular o la expresión génica.

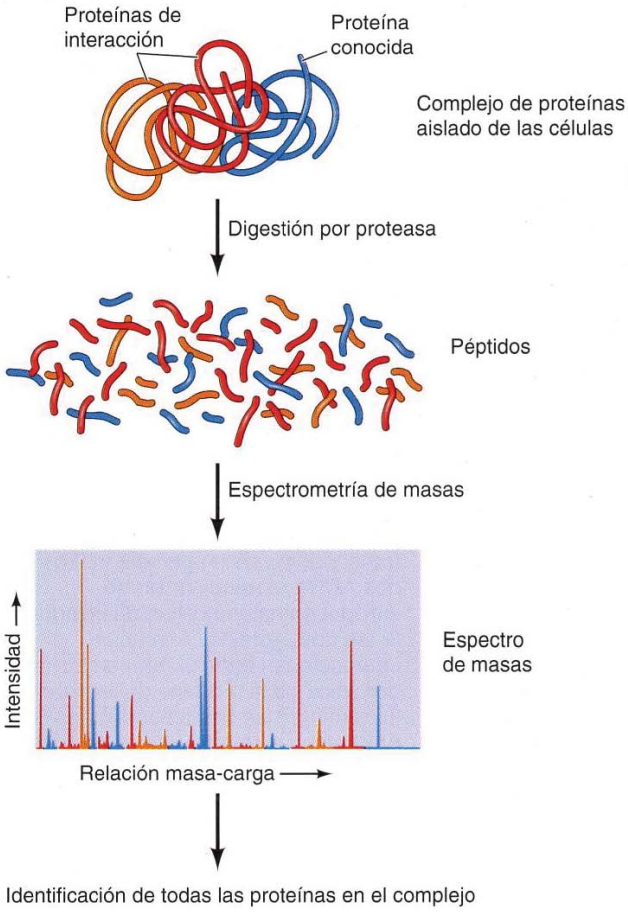


FIGURA 5.12 Análisis de complejos de proteínas. Una proteína conocida (azul) se aísla a partir de células en forma de un complejo con otras proteínas de interacción (amarillo y rojo). Todo el complejo puede analizarse mediante espectrometría de masas para identificar las proteínas de interacción.

Entre los enfoques alternativos a los análisis sistemáticos de complejos de proteínas se incluyen filtros para interacciones proteínicas *in vitro* y filtros genéticos que detectan interacciones entre pares de proteínas introducidos en las células de levadura. La expresión de los genes clonados en la levadura resulta especialmente útil dado que pueden emplearse métodos sencillos de genética para identificar proteínas que interaccionan unas con otras. En este tipo de análisis, denominado **sistema de dos híbridos de levadura**, se unen dos ADNc diferentes (por ejemplo, de células humanas) con dos dominios distintos de una proteína que estimula la expresión de un gen diana en la levadura (**Fig. 5.13**). Las levaduras son transformadas a continuación con los clones de ADNc híbridos para probar las interacciones entre las dos proteínas. Si las proteínas humanas interaccionan entre sí, unirán los dos dominios de la proteína de levadura, para producir la estimulación de la expresión del gen diana en la levadura transformada. La expresión del gen diana puede detectarse fácilmente mediante cultivo de la levadura en un medio específico o por la producción de una enzima que genera una colonia de levadura azul, de manera que el sistema de dos híbridos de levadura proporciona un método sencillo para probar las interacciones entre proteínas.

Los filtros de dos híbridos de levadura de alto rendimiento se han aplicado a filtros sistemáticos de interacciones entre proteínas de organismos eucariotas superiores, entre ellos *Drosophila*, *C. elegans* y los seres humanos. Los filtros han identificado miles de interacciones proteína-proteína, que pueden presentarse como mapas que representan una extensa red de proteínas en interacción dentro de la célula (**Fig. 5.14**). La determinación de estas redes de proteínas supondría un gran paso hacia delante en nuestra comprensión de las complejidades de la regulación celular, así como la iluminación de las funciones de numerosas proteínas hasta ahora no identificadas.

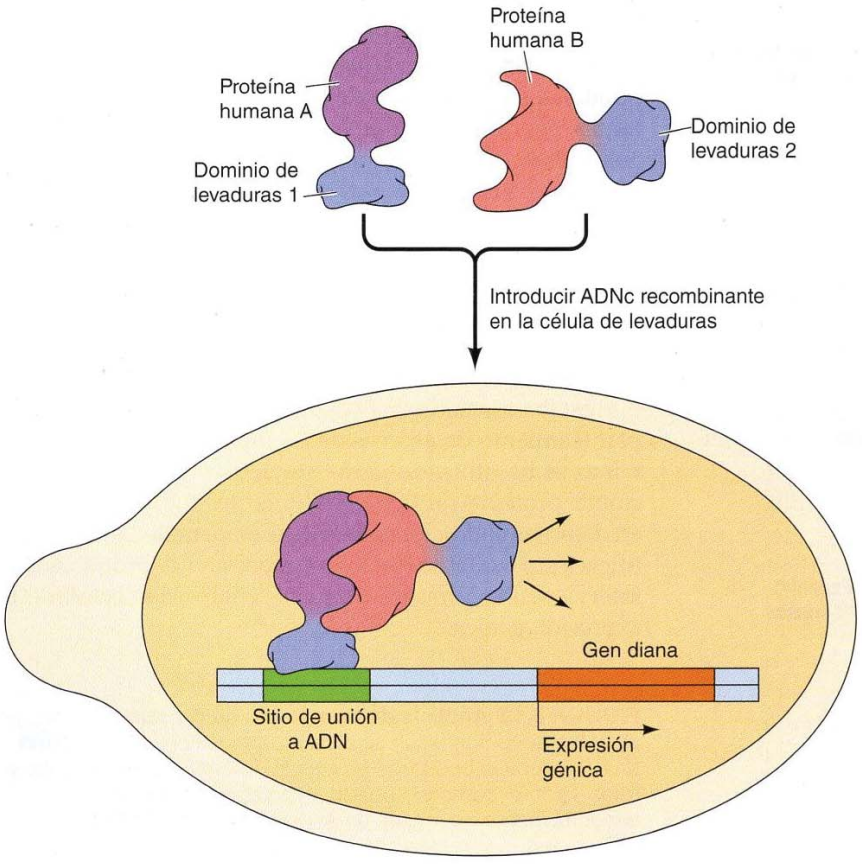


FIGURA 5.13 Sistema de dos híbridos de levaduras. Los ADNc de dos proteínas humanas se clonan como fusiones con dos dominios (designados como 1 y 2) de una proteína de levadura que estimula la transcripción de un gen diana. Los dos ADNc recombinantes se introducen en una célula de levadura. Si las dos proteínas humanas interaccionan entre sí, reúnen los dos dominios de la proteína de levaduras. El dominio 1 se une a secuencias de ADN en un sitio en la dirección 5' del gen diana, y el dominio 2 estimula la transcripción del gen diana. La interacción entre las dos proteínas humanas puede detectarse así mediante la expresión del gen diana en la levadura transformada.

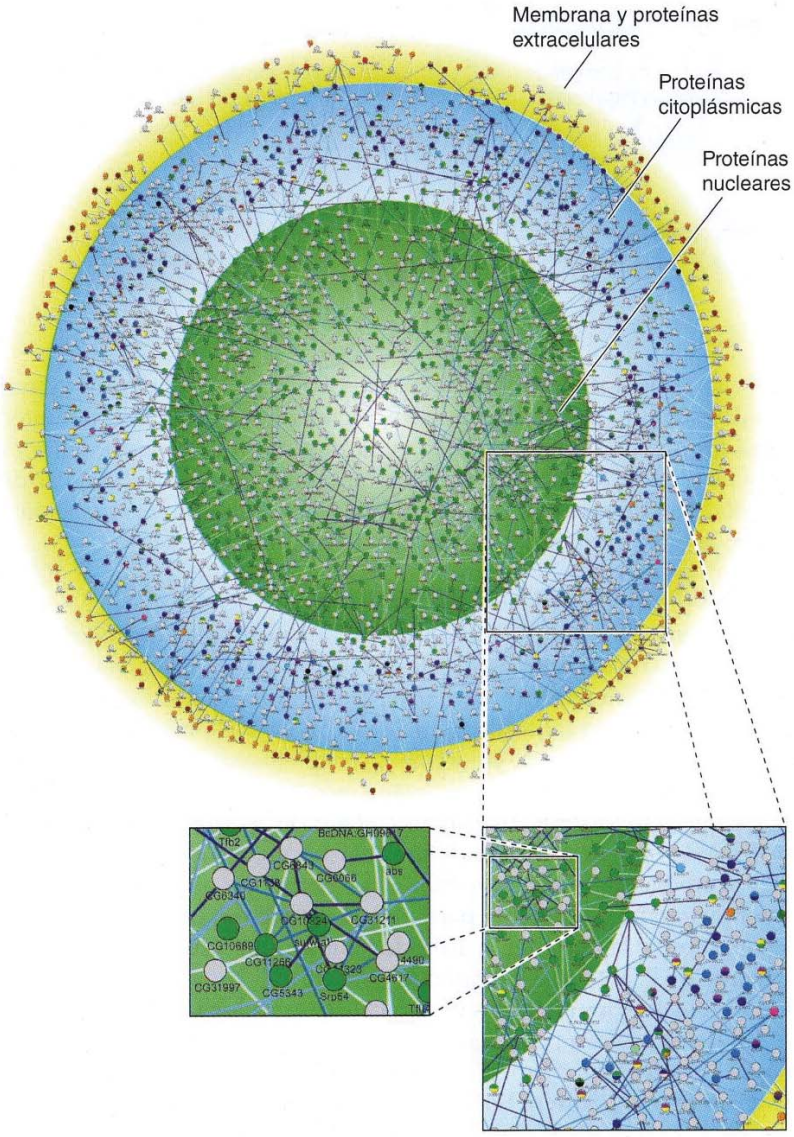


FIGURA 5.14 Mapa de interacción de proteínas de *Drosophila*. Se representan las interacciones entre 2.346 proteínas, donde cada proteína se muestra como un círculo situado de acuerdo con su localización subcelular. (De L. Giot y cols., 2003. *Science* 302; 1727).

Biología de sistemas

Los proyectos de secuenciación del genoma han conducido a un cambio fundamental en la forma en que se plantean muchos problemas de la biología, con enfoques experimentales a gran escala, que generan enormes cantidades de datos actualmente de uso común. El manejo de esta ingente cantidad de datos generados por la secuenciación del genoma completo, requiere un análisis computacional sofisticado y que ha engendrado el nuevo campo de la **bioinformática**. Este campo se sitúa en el punto de encuentro entre la biología y la ciencia informática y se centra en el desarrollo de los métodos computacionales necesarios para analizar y extraer información biológica útil de la secuencia de miles de millones de bases de ADN. Otros tipos de experimentación biológica a gran escala, incluido el análisis global de expresión génica y proteómica, produjeron análogamente enormes cantidades de datos, mucho más allá del ámbito de la experimentación biológica tradicional. Estos enfoques experimentales a gran escala conforman la base del nuevo campo de la **biología de sistemas**, que persigue una comprensión cuantitativa del comportamiento dinámico integrado de los

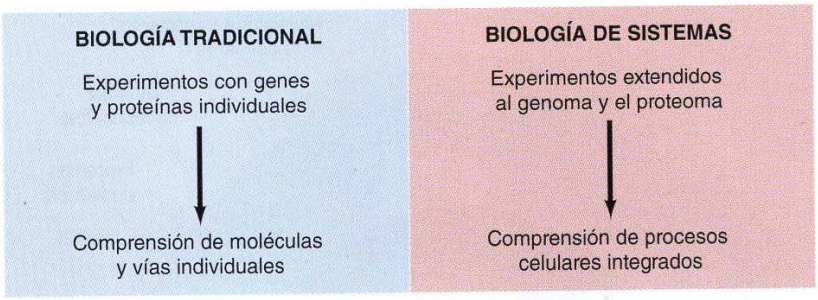


FIGURA 5.15 Biología de sistemas. Los experimentos tradicionales de biología estudian las moléculas y las vías individuales. La biología de sistemas hace uso de datos experimentales globales para la modelización cuantitativa de sistemas y procesos integrados.

sistemas y los procesos biológicos complejos. A diferencia de los enfoques tradicionales, la biología de sistemas se caracteriza por el uso de conjuntos de datos a gran escala para el análisis y la modelización experimentales cuantitativos (**Fig. 5.15**). A continuación se analizan algunas de las áreas de investigación adicionales que pueden alcanzarse con la experimentación a gran escala, la bioinformática y la biología de sistemas.

Análisis sistemático de la función génica

La identificación de todos los genes de un organismo abre la posibilidad de un análisis sistemático a gran escala de la función génica. Una técnica consiste en inactivar sistemáticamente (*knockout*) cada uno de los genes del genoma mediante recombinación homóloga con un alelo mutante inactivo (véase Fig. 4.35). Se dispone de colecciones completas con mutaciones en todos los genes conocidos para varios organismos modelo, como *E. coli*, levadura, *Drosophila*, *C. elegans* y *Arabidopsis thaliana*. Estas colecciones de cepas mutantes pueden analizarse para determinar los genes que intervienen en cualquier propiedad biológica de interés. Se encuentra en marcha un proyecto internacional a gran escala para inactivar sistemáticamente todos los genes en el ratón, y la mutagenia dirigida ha indicado actualmente las funciones de más de 7.000 genes de ratón.

Alternativamente, los análisis a gran escala basados en la interferencia de ARN (ARNi) se emplean para diseccionar sistemáticamente la función génica en una variedad de organismos, incluyendo *Drosophila*, *C. elegans* y células de mamífero en cultivo. En los análisis de ARNi, se emplean ARN de doble hebra para inducir la degradación de ARNm homólogos en células (véase Fig. 4.38). Con la disponibilidad de las secuencias genómicas completas, pueden diseñarse bibliotecas de ARN de doble hebra y emplearse en análisis que abarcan todo el genoma para identificar todos los genes implicados en cualquier proceso biológico que puede estudiarse en un estudio de alto rendimiento. Por ejemplo, el análisis de ARNi de todo el genoma puede utilizarse para identificar los genes necesarios para el crecimiento y viabilidad de células en cultivo (**Fig. 5.16**). ARN de doble hebra individuales de la biblioteca de genoma completo se ensayan en micropocillos en un formato de alto rendimiento para identificar a aquellos que interfieren con el crecimiento de células cultivadas, caracterizando así todo el conjunto de genes que son necesarios para el crecimiento o la supervivencia celulares en ciertas condiciones. Análisis de ARNi similares se han empleado para identificar genes implicados en una diversidad de procesos biológicos, incluyendo vías de señalización celular, degradación proteica y transmisión en las sinapsis del sistema nervioso. Más recientemente, se han aplicado asimismo filtros de todo el genoma que utilizan el sistema CRISPR/Cas (véase Fig. 4.36) para identificar sistemáticamente conjuntos de genes en células humanas que son responsables de propiedades como la supervivencia o la resistencia a fármacos anticancerosos.

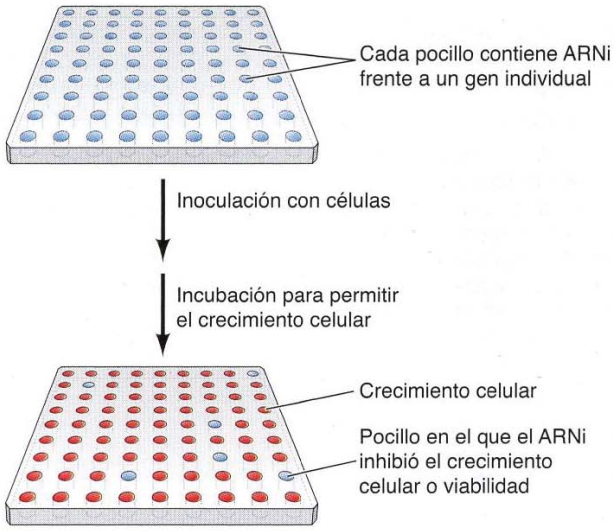


FIGURA 5.16 Análisis de genoma completo mediante ARNi del crecimiento celular y la viabilidad. Cada micropocillo contiene ARNi que corresponde a un gen individual del genoma. El cultivo tisular de células es añadido a cada pocillo e incubado para permitir el crecimiento celular. Los pocillos en los que no puedan crecer las células identifican a los genes necesarios para el crecimiento celular o viabilidad.

Regulación de la expresión génica

Las secuencias genómicas pueden, en principio, desvelar no solo las secuencias codificadoras de proteína de los genes, sino también los elementos reguladores que controlan la expresión génica. Como se analizará en capítulos siguientes, la regulación de la expresión génica es crítica para muchos aspectos de la función celular, incluyendo el desarrollo de complejos organismos multicelulares. La comprensión de los mecanismos que controlan la expresión génica como la transcripción y el procesamiento alternativo es, por tanto, un objetivo central en la biología celular y molecular actual, y la disponibilidad de secuencias genómicas contribuirán sustancialmente a su consecución. Desafortunadamente, es mucho más difícil identificar las secuencias reguladoras de lo que es identificar las secuencias codificadoras de proteína. La mayoría de los elementos reguladores son secuencias cortas de ADN, abarcando generalmente tan solo unos 10 pares de bases. Como consecuencia, las secuencias que se parecen a secuencias reguladoras ocurren frecuentemente por azar en el ADN genómico, de modo que elementos fisiológicamente significativos no pueden identificarse simplemente a partir del ADN. La identificación de elementos reguladores funcionales y la dilucidación de redes de señalización que controlan la expresión génica representan, por tanto, grandes retos para la bioinformática y la biología de sistemas.

La disponibilidad de secuencias genómicas ha permitido a los científicos emprender estudios globales de expresión génica, usando micromatrices o ARN-seq (véase Figs. 5.6 y 5.7), en los que los niveles de expresión de todos los genes de una célula pueden someterse a ensayo de forma simultánea. Estos estudios de los patrones globales de transcripción por micromatrices o secuenciación de ARN se han hecho extraordinariamente valiosos para revelar los cambios globales en la regulación génica asociados con comportamientos discretos de las células, como la diferenciación celular o la respuesta de las células a una hormona o un factor de crecimiento en particular. Dado que los genes que se regulan de forma coordinada en una célula pueden controlarse mediante mecanismos similares, el análisis de los cambios en la expresión de múltiples genes puede ayudar a señalar los elementos reguladores compartidos. Por otra parte, los cambios en la expresión génica que tienen lugar con el tiempo pueden revelar redes de expresión génica.

Una variedad de enfoques informáticos también se están empleando para la caracterización funcional de los elementos reguladores. Uno de los enfoques es el análisis comparativo de secuencias genómicas de organismos relacionados. Esto se basa en asumir que las secuencias funcionalmente importantes están conservadas en la evolución, mientras que los segmentos no funcionales de ADN divergen con mayor rapidez. Los mamíferos conservan alrededor del 5% de la secuencia genómica; dado que una proporción cercana al 1,2% del genoma corresponde a secuencias que codifican proteínas, el 4% restante podría corresponder a secuencias reguladoras de importancia funcional. Por ejemplo, el análisis informático encaminado a la identificación de secuencias no codificantes conservadas en los genomas del ratón, la rata, el perro y la especie humana ha ayudado a definir las secuencias que controlan la transcripción génica (**Fig. 5.17**). Adicionalmente, los elementos reguladores funcionales a menudo se encuentran en grupos o *clusters*, refle-

jando el hecho de que los genes generalmente se encuentran regulados por interacciones de múltiples factores de transcripción (véase Cap. 8). También han resultado útiles los algoritmos informáticos diseñados para detectar grupos de sitios de unión de factores de transcripción en el ADN genómico, para la identificación de secuencias que regulan la expresión génica.

Como se comenta con mayor detalle en el Capítulo 8, se han puesto en marcha proyectos experimentales a gran escala de análisis genómico completo de los sitios de unión de proteínas reguladoras. Además, se han caracterizado modificaciones específicas de las histonas asociadas a genes transcripcionalmente activos o regiones reguladoras de genes, y los análisis en el genoma completo de las localizaciones de estas modificaciones de las histonas pueden servir para lograr una identificación experimental global de las secuencias reguladoras de genes. La aplicación de estas estrategias globales abre nuevas puertas al conocimiento del control de la expresión génica en células de eucariotas complejos. Un ejemplo destacado es el proyecto a gran escala denominado ENCODE (siglas de *E*ncyclopedia of *DNA E*lements, enciclopedia de elementos de ADN), que utilizaba ARN-seq para caracterizar todos los ARN transcritos, así como los métodos globales para determinar las secuencias reguladoras de los genes en 147 tipos diferentes de células humanas. Los resultados de este análisis global han modificado nuestra visión de la estructura y la función de los genomas de mamíferos, como se verá en los capítulos posteriores. De forma muy destacada, aun cuando las secuencias codificantes de proteínas suponen tan sólo aproximadamente el 1% del genoma humano, más del 50% de nuestro genoma se transcribe, y muchas de estas secuencias no codificantes transcritas desempeñan funciones importantes en la regulación génica.

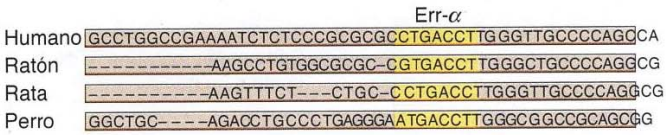


FIGURA 5.17 Conservación de los elementos reguladores de genes funcionales. Las secuencias humanas, de ratón, de rata y de perro cerca del lugar de inicio de la transcripción de un gen contienen un elemento regulador funcional que une la proteína reguladora de transcripción Err-α. Estas secuencias (resaltadas en amarillo) se conservan en los cuatro genomas, mientras que no lo hacen las secuencias circundantes. (Según X. Xie y cols., 2005, *Nature* 434: 338).

Redes

La biología experimental clásica se centra en genes o proteínas individuales, que a menudo actúan en secuencia para catalizar una serie de reacciones que constituyen una vía. En el Capítulo 3 se habló de varias vías metabólicas formadas por dichas series de reacciones. Por ejemplo, la glicólisis (descomposición de la glucosa en piruvato) está mediada por la acción en secuencia de nueve enzimas diferentes (véase Fig. 3.2). Las vías de señalización actúan de modo semejante para transmitir información desde el entorno, por ejemplo acerca de la presencia de una hormona, a las dianas dentro de la célula. Por ejemplo, la hormona epinefrina señaliza la descomposición del glucógeno en glucosa en las células musculares (véase Fig. 2.30). Esta respuesta a la epinefrina está mediada por una vía de señalización formada por seis proteínas diferentes (**Fig. 5.18**).

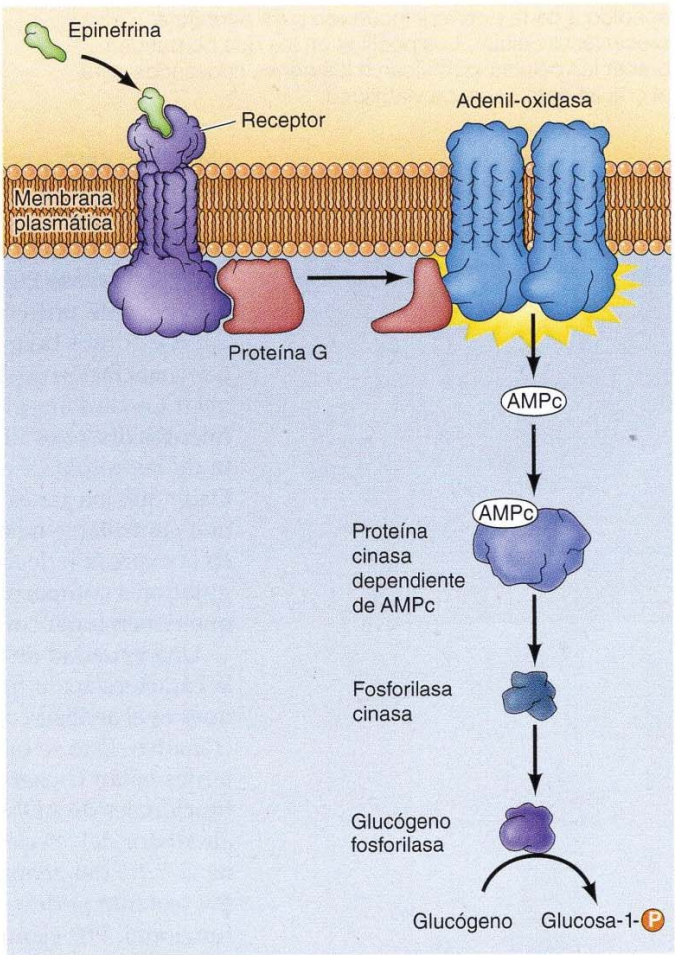


FIGURA 5.18 Ejemplo de vía de señalización. La unión de epinefrina (adrenalina) a su receptor de la superficie celular activa una vía de señalización que lleva a la descomposición del glucógeno en glucosa-1-fosfato.

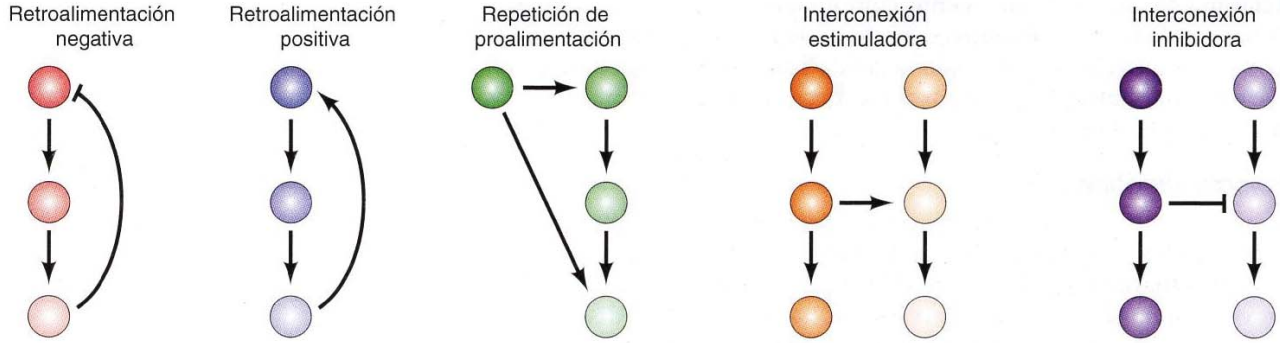


FIGURA 5.19 Elementos de las redes de señalización. En los bucles de retroalimentación, un elemento en la dirección 3′ de una vía inhibe (retroalimentación negativa) o estimula (retroalimentación positiva) un elemento en la dirección 5′. En repeticiones de proalimentación, un elemento en la dirección 5′ de una vía estimula su diana inmediata y otro elemento más en dirección 3′. La interconexión tiene lugar cuando un elemento de una vía estimula o inhibe un elemento de una segunda vía.

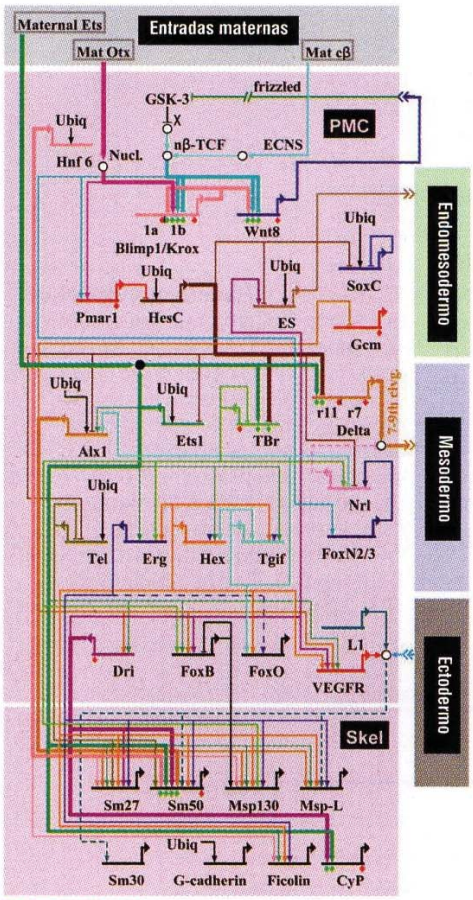


FIGURA 5.20 Una red reguladora de genes. La red incluye todos los genes reguladores necesarios para el desarrollo de las células embrionarias que se diferencian en células esqueléticas en el erizo de mar. (De P. Oliveri, Q. Tu y E. H. Davidson, 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 105: 5955).

Las actividades de las vías individuales han sido determinadas por métodos clásicos de análisis de pequeños números de genes o proteínas. Sin embargo, la señalización dentro de la célula es bastante más complicada que las actividades de las vías individuales. Las vías de señalización o metabólicas no actúan de forma aislada; al contrario, existe una interconexión extensa entre diferentes vías, de manera que varias de ellas interaccionan entre sí para formar **redes** dentro de la célula. La modelización computacional de dichas redes es, en la actualidad, un importante reto de la biología de sistemas, que tendrá que comprender necesariamente la respuesta dinámica de las células a su entorno.

En la **Figura 5.19** se ilustran algunas de las formas de interconexión entre las vías. La actividad de muchas de estas vías está controlada por **bucles de retroalimentación**. Un ejemplo de bucle de retroalimentación negativa es el suministrado por la inhibición de retroalimentación de vías metabólicas (véase Fig. 2.28). Además de los bucles de retroalimentación negativa, las redes de señalización pueden contener bucles de retroalimentación positiva y **repeticiones de proalimentación** en las que la actividad de un componente de una vía estimula a un componente distante en la dirección 3′. Las vías individuales se comunican para formar redes por **interconexión**, que alude a la interacción de una vía con otra. La interconexión entre diferentes vías puede ser positiva (una vía estimula a la otra) o negativa (una vía inhibe a la otra).

Para comprender plenamente la señalización celular se necesita desarrollar modelos de redes que predigan el comportamiento dinámico de las vías interconectadas que dan lugar en última instancia a una respuesta biológica. Con la visión de la célula como un sistema integrado, se necesitarán claramente modelos matemáticos y simulaciones informáticas para abordar la complejidad del problema. Por ejemplo, muchas vías de señalización (analizadas en el Capítulo 16) terminan por afectar a la expresión génica. El genoma humano codifica más de 4.000 proteínas que actúan en estas vías, con lo que el potencial de regulación cruzada entre las vías formadas a partir de las combinaciones de estos elementos es inmenso. Un modelo de reciente desarrollo de una red reguladora de genes responsable del desarrollo de un linaje celular embrionario en los erizos de mar proporciona una representación gráfica de esta complejidad (**Fig. 5.20**). Aunque se tra-

ta claramente de una tarea ingente, comprender las redes reguladoras de las células en términos cuantitativos mediante el empleo de enfoques matemáticos y computacionales que ven la célula como un sistema biológico integrado es un problema de importancia crucial en la vanguardia de la investigación de la biología celular.

Biología sintética

La **biología sintética** es un enfoque de ingeniería dirigido a comprender y manipular los sistemas biológicos. En lugar de estudiar sistemas biológicos existentes (naturales), el objetivo de la biología sintética es diseñar y crear nuevos sistemas (no naturales o sintéticos). Mediante el diseño de estos nuevos sistemas, los expertos en biología sintética confían no sólo en crear productos útiles sino además en comprender mejor cómo controlar el comportamiento de las células existentes.

Un enfoque adoptado por los expertos en biología sintética consiste en sintetizar nuevas moléculas con propiedades biológicas. Un ejemplo es el proporcionado por la síntesis de moléculas de ARN que son capaces de autorreplicarse y que aportaron una demostración fundamental de la capacidad del ARN de actuar como primera molécula de autorreplicación en la evolución prebiótica (véase Capítulo 1). Alternativamente, muchos de estos biólogos especializados diseñan nuevos sistemas que utilizan componentes de células existentes, los cuales reensamblan de formas distintas para producir propiedades funcionales diferenciadas. El enfoque de ingeniería propio de la biología sintética no sólo es importante para diseñar sistemas biológicos con funciones útiles, sino que además es complementario al enfoque analítico de la biología de sistemas para comprender las células naturales. La capacidad de diseñar un nuevo sistema biológico pone a prueba y amplía nuestro conocimiento de los principios que rigen la función de los sistemas naturales.

Los primeros sistemas diseñados por expertos en biología sintética fueron circuitos genéticos preparados en *E. coli* por los laboratorios de James Collins y Stanislas Leibler en 2000. Uno de estos sistemas, denominado báscula genética, fue diseñado para dotar de estabilidad y memoria a una red de regulación de la expresión génica. El sistema está formado por tres genes: un gen indicador que codifica un indicador fácilmente detectable de la expresión génica y dos genes reguladores que codifican represores susceptibles de ser inactivados por la adición de inductores de moléculas pequeñas (**Fig. 5.21**). La característica clave responsable de la estabilidad de este circuito diseñado por ingeniería es que los dos represores controlan la expre-

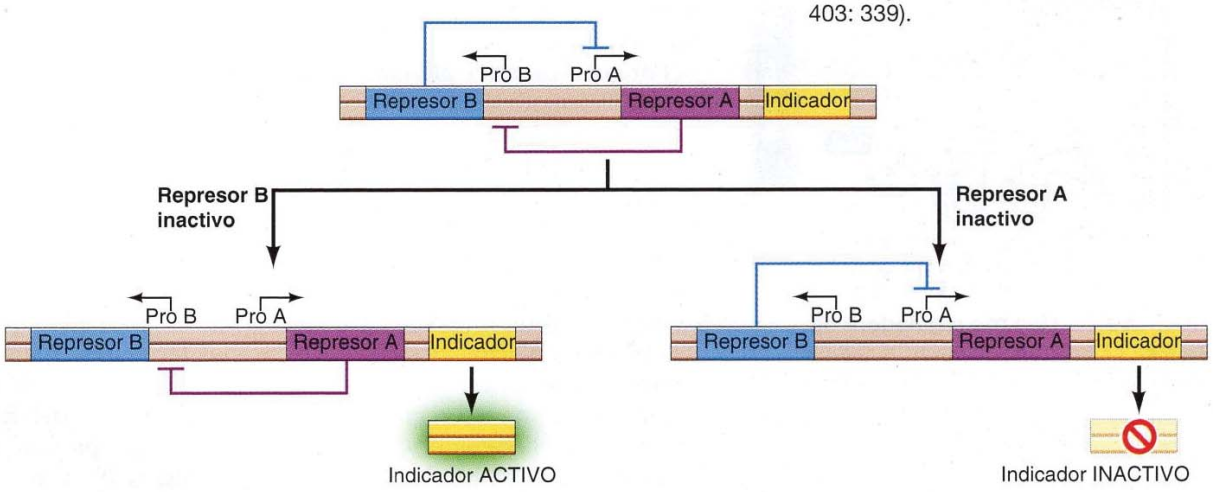


FIGURA 5.21 Basculador genético. El circuito incluye genes que codifican dos represores (A y B) que se regulan entre sí y un indicador controlado por el represor B. La inactivación del represor B conduce a un estado estable en el cual se expresa el indicador, mientras que la inactivación del represor A lleva a un estado estable en el cual se reprime el indicador. (Según T. S. Gardner, C. R. Cantor y J. J. Collins, 2000. *Nature* 403: 339).

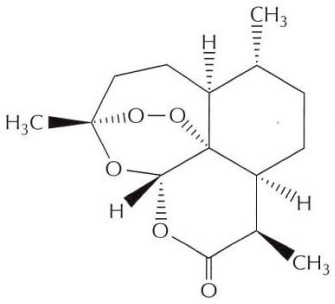


FIGURA 5.22 Estructura de la artemisinina. El tratamiento más eficaz contra la malaria provocada por el parásito *P. falciparum* es la artemisinina en combinación con otros fármacos antipalúdicos.

sión del otro y también del indicador. El represor A bloquea la expresión del represor B, y el represor B bloquea la expresión del represor A y del gen indicador. A modo de ejemplo de la estabilidad del sistema pueden considerarse los efectos de añadir un inductor de moléculas pequeñas que inactiva el represor B. En ausencia de represor B, se expresan el represor A y el gen indicador. Es importante observar que el sistema permanecerá en este estado aun cuando se retire el inductor, dado que el represor A seguirá impidiendo la expresión del represor B. Por el contrario, si se inactiva el represor A, el represor B se expresará y la expresión del gen indicador, así como la ulterior del represor A, se interrumpirán de forma estable. De este modo, el sistema puede conmutar entre dos estados estables. Desde entonces se han diseñado circuitos genéticos similares en modelos de eucariotas, entre ellos levaduras y células de mamíferos. La ingeniería de estos sistemas ha llevado a un avance sustancial de nuestra comprensión sobre el modo en que un circuito regulador puede alternar entre dos estados estables, una característica común de las redes que intervienen en muchos aspectos de la señalización celular y la regulación de la proliferación celular, tal como se abordará en capítulos posteriores.

Las aplicaciones prácticas de la biología sintética incluyen la ingeniería de vías metabólicas para producir de manera eficiente fármacos terapéuticos. Un buen ejemplo es el de la producción del fármaco antipalúdico artemisinina (**Fig. 5.22**). La malaria o paludismo es un problema sanitario global de primera importancia que afecta a más de 200 millones de personas y es responsable de más de 600.000 muertes al año. Está causado por infección con parásitos del género *Plasmodium*, por lo general *P. falciparum*. El tratamiento más eficaz contra la malaria provocada por *P. falciparum* es la artemisinina en combinación con otros antipalúdicos (la denominada terapia de combinación de artemisinina, o TCA). Por desgracia, la artemisinina es producida por una planta (el ajenjo dulce) que necesita ocho meses para alcanzar su tamaño final, y su suministro ha sido inestable, con el resultado de escasez del producto y fluctuaciones importantes de los precios. Para abordar este problema y desarrollar una fuente no botánica de artemisinina, Jay Keasling y sus colaboradores han diseñado cepas de levadura que producen ácido artemisínico en alto rendimiento. En 2013, la empresa farmacéutica Sanofi anunció el lanzamiento de un nuevo centro para producir artemisinina mediante este procedimiento, y desde 2014 se han producido más de 16 millones de tratamientos.

◆ El equipo que diseñó el primer cromosoma sintético de la levadura estaba formado principalmente por investigadores antes de su graduación universitaria.

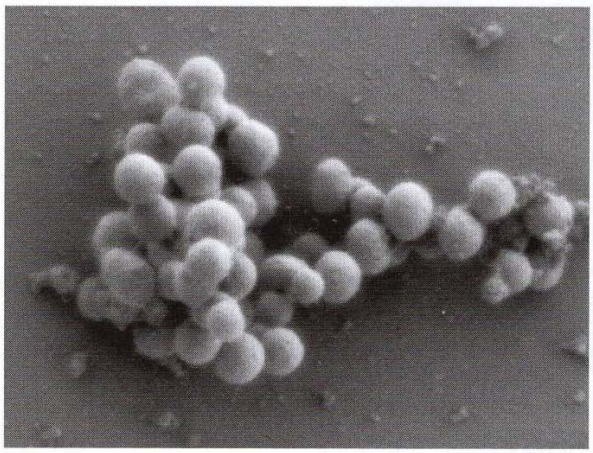
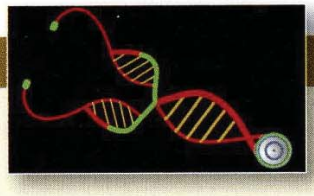


FIGURA 5.23 Primera célula con un genoma sintético. Micrografía electrónica de *M. mycoides* con un genoma sintético. (De D. G. Gibson y cols., 2010. *Science* 329: 52).

Puede considerarse que el objetivo final de la biología sintética es la creación de una célula sintética completa. En este sentido se ha alcanzado un hito con la creación de la primera célula con un genoma completamente sintético en 2010. A partir de la secuencia de nucleótidos conocida del genoma de *Mycoplasma myocides* de 1,08 Mb, Craig Venter y sus colaboradores sintetizaron oligonucleótidos de superposición correspondientes a la secuencia completa del genoma. Estos oligonucleótidos sintéticos se ensamblaron posteriormente en varios pasos para producir un genoma sintético completo de 1.077.947 bases que también contenían las secuencias necesarias para la propagación como un plásmido en la levadura. El genoma sintético se propagó como un plásmido en la levadura y después se introdujo en una subespecie de micoplasma diferente, *M. capricolum*, por técnicas de transferencia génica. Las células que contenían el genoma sintético se seleccionaron por resistencia a la tetraciclina y se propagaron en cultivo. La secuenciación de sus genomas indicó que procedían comple-



MEDICINA MOLECULAR

Malaria y biología sintética

La enfermedad

La malaria está causada por un parásito transmitido por mosquitos infectados y es la enfermedad parasitaria más importante que afecta al ser humano. Los síntomas son escalofríos intensos, vómitos y fiebre, de tipo gripal. Si no se trata, la enfermedad puede producir complicaciones graves e incluso la muerte. La Organización Mundial de la Salud estima que en 2013 hubo 198 millones de casos de malaria y se produjeron 584.000 muertes, el 90% de las mismas en África.

Bases moleculares y celulares

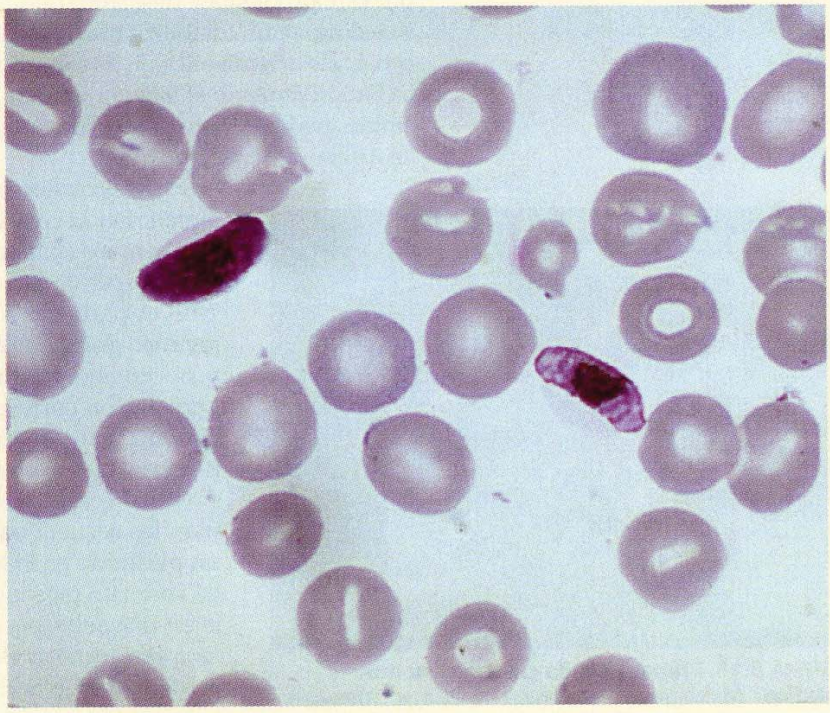
Los parásitos que provocan la malaria son protozoos pertenecientes al género *Plasmodium*. En el ser humano, son cinco las especies causantes: *P. falciparum, P. malariae, P. ovale, P. vivax* y *P. knowlesi*. Aproximadamente el 75% de los casos y casi todas las muertes se deben a *P. falciparum* (véase la figura). La enfermedad es transmitida por la picadura de un mosquito *Anopheles*. Después, el parásito se desplaza hasta el hígado y se reproduce en los hepatocitos para producir una progenie de miles de protozoos. Esta progenie infecta y se replica en los eritrocitos, que experimentan lisis y liberan más parásitos, que infectan a su vez otros eritrocitos y atraviesan por varias tandas de replicación. Los parásitos de la sangre provocan los síntomas de la enfermedad y pueden ser capturados por un mosquito para prolongar la transmisión.

Prevención y tratamiento

El desarrollo de una vacuna contra la malaria es una alta prioridad de la investigación en salud pública, aunque en la actualidad no se dispone de ninguna vacuna antipalúdica. Así pues, los esfuerzos de prevención de la enfermedad se concentran en medidas para evitar la picadura de los mosquitos, con repelentes contra insectos, el uso de mosquiteras en las camas o los insecticidas. Las personas que se desplazan a zonas con prevalencia de malaria pueden tomar varios tipos de antipalúdicos, la mayor parte de los cuales se utilizan también para el tratamiento. Sin embargo, la prevención con estos fármacos no resulta práctica en los residentes en las zonas afectadas por la malaria, debido a su coste y a los efectos secundarios del uso prolongado.

El primer tratamiento eficaz contra la malaria fue la quinina, sustituida por la cloroquina en los años cuarenta. Por desgracia, en los años cincuenta se desarrollaron cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina, y en la actualidad están muy extendidas. La terapia actual más eficaz contra la malaria asociada a *P. falciparum* es la artemisinina, que fue descubierta por la científica china Tu Youyou en los años setenta. Se administra como una terapia de combinación con otros antipalúdicos, para prevenir el desarrollo de cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina.

La artemisinina fue descubierta en las hojas de la especie *Artemisia annua* (ajenjo dulce), que por desgracia proporciona un aporte limitado del fármaco. Las plantas tardan unos ocho meses en alcanzar su tamaño final y, debido a su inestable disponibilidad, los precios en el mercado de la artemisinina han fluctuado en los últimos años en intervalos del orden de diez veces. El trabajo de los expertos en biología sintética ha contribuido de forma importante a resolver este problema al diseñar una cepa de levadura que produce altas concentraciones de ácido artemisínico, el cual, por medios químicos, puede convertirse eficazmente en artemisinina. A partir de la eficaz producción de artemisinina mediante esta levadura artificial, la empresa farmacéutica Sanofi fundó un centro de producción de artemisinina en 2013 y ha producido más de 16 millones de tratamientos desde 2014.



P. falciparum en un frotis de sangre.

tamente del ADN sintético de *M. mycoides*, y se determinó que las células con el genoma sintético crecían con normalidad y mostraban la morfología de *M. mycoides* normal (**Fig. 5.23**). Estos micoplasmas representan así las primeras células con un genoma sintético puro. Dado que todas las proteínas celulares están especificadas por este genoma, con las proteínas presentes en la célula receptora original diluidas durante la replicación, estos micoplasmas constituyen también las primeras células sintéticas. En la actualidad, los esfuerzos realizados se dirigen al diseño de un genoma sintético de levadura como modelo para diseñar una célula de eucariota. Dados los costes cada vez más bajos de la síntesis de ADN, en un futuro próximo parece viable la posibilidad de diseñar por ingeniería genomas de plantas y animales.

RESUMEN

Genomas y transcriptomas

Genomas de bacterias y levaduras: los genomas bacterianos son extremadamente compactos; las secuencias codificadoras de proteínas suponen cerca del 90% del ADN. El genoma de *E. coli* está formado por $4{,}6 \times 10^6$ pares de bases de ADN y contiene unos 4.200 genes. El primer genoma eucariota secuenciado fue el de la levadura *S. cerevisiae*, que tiene aproximadamente 6.000 genes, y las secuencias codificadoras de proteínas suman cerca del 70% del total.

***Genomas de* Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster y Arabidopsis thaliana:** El genoma de *C. elegans* fue el primer genoma secuenciado de un organismo multicelular. El genoma de *C. elegans* contiene unas 19.000 genes codificadores de proteína, que corresponden solamente al 25% del genoma. El genoma de *Drosophila* contiene aproximadamente 14.000 genes, con secuencias codificadoras de proteína correspondiendo al 10% del genoma. El número de genes identificado en estas especies indica que la cantidad de genes no presenta una relación directa con la complejidad biológica de un organismo. Análogamente, el genoma de la pequeña planta de flor *Arabidopsis thaliana* contiene unos 26.000 genes, lo que sorprende al ser una cifra más alta que las descritas en *Drosophila* o *C. elegans*. Los genomas de otras plantas también contienen un gran número de genes, como los cerca de 57.000 genes que tiene la manzana. El elevado número de genes de estas plantas subraya, además, la inexistencia de una relación entre el número de genes y la complejidad de un organismo.

Ver Vídeo 5.1

El genoma humano: El genoma humano parece contener aproximadamente 21.000 genes que codifican proteínas —sólo el doble del número de genes encontrados en animales más sencillos como *Drosophila* o *C. elegans* y menos en *Arabidopsis* y otras plantas.

Los genomas de otros vertebrados: Los genomas de peces, pollos, ratones, ratas, perros, macacos rhesus, chimpancés y neandertales constituyen elementos de comparación importantes para el genoma humano. Todos estos vertebrados tienen un número similar de genes.

Secuenciación de la siguiente generación y genomas personales: En la actualidad, los importantes avances en la tecnología de secuenciación de ADN han hecho viable determinar la secuencia completa de genomas individuales.

Ver Animación 5.1

Análisis global de la expresión génica: Los ARN expresados en una célula pueden analizarse globalmente mediante hibridación en micromatrices de ADN o por secuenciación de la siguiente generación.

Ver Animación 5.2

PALABRAS CLAVE

marco de lectura abierto

secuenciación de la siguiente generación

transcriptoma, micromatriz de ADN, ARN-seq

RESUMEN

Proteómica

Identificación de proteínas celulares: La caracterización del complemento proteínico completo de las células es un objetivo importante de la proteómica. La espectrometría de masas proporciona una poderosa herramienta para la identificación de proteínas, que puede utilizarse para identificar las proteínas aisladas o las presentes en mezclas.

proteómica, proteoma, electroforesis en gel bidimensional, espectrometría de masas, espectrometría de masas en tándem

Análisis global de la posición de las proteínas: Los orgánulos subcelulares aislados pueden analizarse mediante espectrometría de masas para determinar sus constituyentes proteínicos.

Interacciones entre proteínas: La purificación de los complejos de proteínas de las células y el análisis de las interacciones de proteínas introducidas en la levadura pueden identificar las proteínas en interacción y llevar a la determinación de las redes complejas de interacciones proteínicas que regulan el comportamiento de la célula.

inmunoprecipitación, sistema de dos híbridos de levadura

Biología de sistemas

Análisis sistemático de la función génica: Los proyectos de secuenciación genómica han introducido técnicas de experimentación a gran escala e informáticos a la investigación en biología celular y molecular. Los análisis de genoma completo que emplean la interferencia de ARN o el sistema CRISPR/Cas pueden identificar sistemáticamente todos los genes de un organismo que están implicados en cualquier proceso biológico que puede ensayarse en un formato de alto rendimiento.

bioinformática, biología de sistemas

Regulación de la expresión génica: La identificación de secuencias reguladoras génicas y la comprensión de los mecanismos que controlan la expresión génica son grandes retos para la bioinformática y la biología de sistemas. Los problemas se están enfocando mediante estudios en genomas completos de la expresión génica, combinada con el desarrollo de técnicas informáticas para identificar los elementos reguladores funcionales.

Redes: La actividad de las vías de señalización dentro de la célula está regulada por bucles de retroalimentación que controlan la magnitud y la duración de la señalización. Además, diferentes vías de señalización interaccionan para regular sus actividades mutuamente. La extensa interconexión entre vías individuales conduce a la formación de redes de señalización complejas que en última instancia controlan el comportamiento de la célula.

red, bucle de retroalimentación, repetición de proalimentación, interconexión

Biología sintética: La biología sintética es un enfoque de ingeniería que persigue comprender la biología, con el objetivo de diseñar nuevos sistemas biológicos. Entre los sistemas diseñados por los expertos en biología sintética se incluyen circuitos genéticos, vías metabólicas y genomas sintéticos.

biología sintética

PALABRAS CLAVE

Preguntas

1. ¿Cómo pueden identificarse las secuencias codificantes de proteínas en la secuencia de ADN de un genoma?
2. ¿Cuál es la comparación entre la fracción de una secuencia codificante de proteínas del genoma humano y la del genoma de la levadura?
3. ¿Cuál es la comparación entre el número de genes del genoma humano y el de las manzanas?
4. Explica el uso de la espectrometría de masas para identificar una proteína.
5. ¿Cómo podría compararse la composición proteínica de las mitocondrias a partir de células cancerígenas y células normales?
6. ¿Cómo se utiliza la inmunoprecipitación para estudiar las interacciones entre proteínas?
7. ¿De qué modo se utiliza la interferencia de ARN para identificar genes que pueden ser dianas adecuadas para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer de mama?
8. Explica el uso de la secuenciación de la siguiente generación para estudiar la expresión génica.
9. ¿Por qué es más difícil identificar las secuencias reguladoras que las secuencias codificantes de proteínas?
10. ¿Cómo puede contribuir la biología sintética a la comprensión de los sistemas biológicos naturales?

Bibliografía

Genomas y transcriptores

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195. [P]

Bentley, D. R. and 193 others. 2008. Accurate whole genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456: 53–59. [P]

Blattner, F. R. and 16 others. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K–12. *Science* 277: 1453–1462. [P]

Collins, F. 2010. Has the revolution arrived? *Nature* 464: 674–675. [R]

Fleischmann, R. D., and 39 others. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496–512. [P]

Hawkins, R. D., G. C. Hon and B. Ren. 2010. Next-generation genomics: an integrative approach. *Nature Rev. Genet.* 11: 476–486. [R]

Holt, R. A. and S. J. M. Jones. 2008. The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Res.* 18: 839–846. [R]

Howe, K. and 171 others. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945. [P]

Levy, S. and 30 others. 2007. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biology* 5: e254. [P]

Lindblad-Toh, K. and 46 others. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438: 803–819. [P]

Mardis, E. R. 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470: 198–203. [R]

Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies—the next generation. *Nature Rev. Genet.* 11: 31–46. [R]

Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562. [P]

Ozsolak, F. and P. M. Milos. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Rev. Genet.* 12: 87–98. [R]

Pennisi, E. 2011. Green genomes. *Science* 332: 1373–1375. [R]

Prufer, K. and 40 others. 2012. The bonobo genome compared with the chimpanzee and human genomes. *Nature* 486: 527–531. [P]

Prufer, K. and 44 others. 2014. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505: 43–49. [P]

Rat Genome Sequencing Project Consortium. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493–521. [P]

Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium. 2007. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* 316: 222–234. [P]

Rogers, J. and R. A. Gibbs. 2014. Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Nature Rev. Genet.* 5: 347–359. [R]

Stegle, O., S. A. Teichmann and J. C. Marioni. 2015. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nature Rev. Genet.* 16: 133–145. [R]

The 1000 Genomes Project Consortium. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061–1073. [P]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018. [P]

The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* 437: 69–87. [P]

The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57–74. [P]

Venter, J. C. 2010. Multiple personal genomes await. *Nature* 464: 676–677. [R]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351. [P]

Wheeler, D. A. and 26 others. 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872–876. [P]

Proteómica

Ahmad, Y. and A. I. Lamond. 2014. A perspective on proteomics in cell biology. *Trends Cell Biol.* 24: 257–264. [R]

Ahrens, C. H., E. Brunner, E. Qeli, K. Basler, and R. Aebersold. 2010. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 789–801. [R]

Breker, M. and M. Schuldiner. 2014. The emergence of proteome-wide technologies: systematic analysis of proteins comes of age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 453–464. [R]

Domon, B. and R. Aebersold. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312: 212–217. [R]

Gavin, A.-C. and 37 others. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141–147. [P]

Gingras, A.-C., M. Gstaiger, B. Raught and R. Aebersold. 2007. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 645–654. [R]

Giot, L. and 48 others. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302: 1727–1736. [P]

Gstaiger, M. and R. Aebersold. 2009. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nature Rev. Genet.* 10: 617–627. [R]

Krogan, N. J. and 52 others. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440: 637–643. [P]

Walther, T. C. and M. Mann. 2010. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol.* 190: 491–500. [R]

Yates, J. R. III., A. Gilchrist, K. E. Howell and J. J. M. Bergeron. 2005. Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 702–714. [R]

Sistema biológico

Annaluru, N. and 79 others. 2014. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science* 344: 55–58. [P]

Chuang, H.-Y., M. Hofree and T. Ideker. 2010. A decade of systems biology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 26: 721–744. [R]

Elnitski, L., V. X. Jin, P. J. Farnham and S. J. M. Jones. 2006. Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques. *Genome Res.* 16: 1455–1464. [R]

Elowitz, M. B. and S. A .Liebler. 2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403: 335–338. [P]

Eungdamrong, N. J. and R. Iyengar. 2004. Computational approaches for modeling regulatory cellular networks. *Trends Cell Biol.* 14: 661–669. [R]

Gardner, T. S., C. R. Cantor and J. J. Collins. 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 403: 339–342. [P]

Ge, H., A. J. M. Walhout and M. Vidal. 2003. Integrating 'omic' information: A bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet.* 19: 551–559. [R]

Gibson, D. G. and 23 others. 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329: 52–56. [P]

Janes, K. A. and D. A. Lauffenburger. 2013. Models of signalling networks—what cell biologists can gain from them and give to them. *J. Cell Science* 126: 1913–1921. [R]

Kirschner, M. W. 2005. The meaning of systems biology. *Cell* 121: 503–504. [R]

Kitano, H. 2002. Systems biology: A brief overview. *Science* 295: 1662–1664. [R]

Komili, S. and P. Silver. 2008. Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nature Rev. Genet.* 9: 38–48. [R]

Le Novère, N. 2015. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nature Rev. Genet.* 16: 146–158. [R]

Lienert, F., J. J. Lohmueller, A. Garg and P. A. Silver. 2014. Synthetic biology in mammalian cells: next generation research tools and therapeutics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 95–107. [R]

Mohr, S. E., J. A. Smith, C. E. Shamu, R. A. Neumüller and N. Perrimon. 2014. RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 591–600. [R]

Nurse, P. and J. Hayles. 2011. The cell in an era of systems biology. *Cell* 144: 850–854. [R]

Oliveri, P., Q. Tu and E. H. Davidson. 2008. Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5955–5962. [P]

Paddon, C. J. and 49 others. 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496: 528–532. [P]

Papin, J. A., T. Hunter, B. O. Palsson and S. Subramaniam. 2005. Reconstruction of cellular signaling networks and analysis of their properties. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 99–111. [R]

Shalem, O., N. E. Sanjana and F. Zhang. 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Rev. Genet.* 16: 299–311. [R]

Wang, T., J. J. Wei, D. M. Sabatini and E. S. Lander. 2014. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343: 80–84. [P]

Wasserman, W. W. and A. Sandelin. 2004. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Rev. Genet.* 5: 276–287. [R]

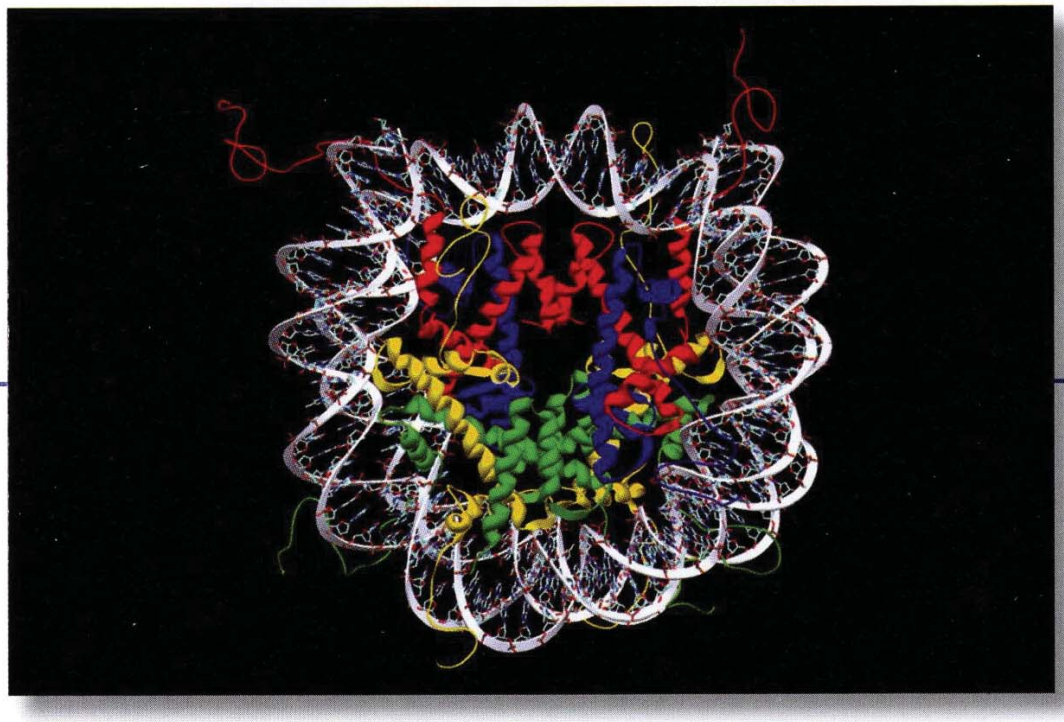
White, J. K. and 30 others. 2013. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* 154: 452–464. [R]

Xie, X., J. Lu, E. J. Kulbokas, T. R. Golub, V. Mootha, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander and M. Kellis. 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3′ UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434: 338–345. [P]

Zhu, X., M. Gerstein and M. Snyder. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev.* 21: 1010–1024. [R]

Parte II

Flujo de la información genética

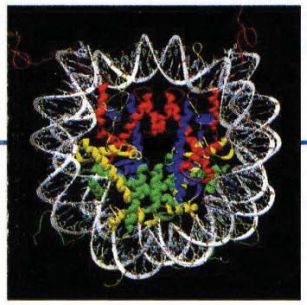


Capítulo 6 **Genes y genomas**

Capítulo 7 **Replicación, mantenimiento y reorganización del ADN genómico**

Capítulo 8 **Síntesis y maduración del ARN**

Capítulo 9 **Síntesis, procesamiento y regulación de las proteínas**



Capítulo 6

Genes y genomas

La estructura de los genes eucariotas 187

Secuencias no codificantes 194

Cromosomas y cromatina 204

EXPERIMENTO CLAVE:

Descubrimiento de los intrones 190

EXPERIMENTO CLAVE:

El proyecto ENCODE 195

Como material genético, el ADN proporciona un patrón que dirige todas las actividades celulares y determina el plan de desarrollo de los organismos multicelulares. Por lo tanto, entender la estructura genética y su función resulta fundamental para obtener una visión de la biología molecular de las células. El desarrollo de la clonación de genes ha supuesto un gran paso hacia estos objetivos, permitiendo a los científicos diseccionar genomas eucariotas complejos y probar las funciones de los genes eucarióticos. Tal como se expuso en el capítulo anterior, los avances en la secuenciación del ADN nos han conducido al estimulante resultado de conocer las secuencias completas del genoma de centenares de bacterias, levaduras y numerosas especies de plantas y animales, incluido el ser humano. En el presente capítulo se analizará la organización de los genes de organismos eucariotas y los tipos de secuencias propios de los genomas de los eucariotas superiores, muchos de los cuales tienen cometidos importantes en la regulación génica, más que en la codificación de proteínas.

La estructura de los genes eucariotas

Los genomas de la mayoría de los eucariotas son grandes y más complejos que los de procariotas (**Fig. 6.1**). El gran tamaño de los genomas eucariotas no resulta sorprendente, puesto que uno debe esperar encontrar más genes en organismos que son más complejos. Sin embargo, el tamaño del genoma de muchos eucariotas no parece estar relacionado con la complejidad genética. Por ejemplo, los genomas de las salamandras y lirios contienen diez veces más cantidad de ADN que la encontrada en el genoma humano, y estos organismos no son diez veces más complejos que los humanos. Por otra parte, como se indicó en el Capítulo 5, el número de genes en los genomas eucariotas no está relacionado de forma sencilla con el tamaño del genoma ni con la complejidad biológica. Por ejemplo, el genoma humano es mil veces mayor que el de *E. coli*, pero contiene únicamente un número de genes cinco veces superior. Y aunque el genoma de la pequeña planta *Arabidopsis thaliana* es de apenas el 5% del tamaño del genoma humano, contiene aproximadamente 26.000 genes codificantes de proteínas, en comparación con los 21.000 del genoma humano.

Estas discrepancias se han resuelto mediante el descubrimiento de que los genomas de la mayoría de las células eucariotas contienen no sólo secuencias codificantes de proteínas, sino también grandes cantidades de ADN que no codifica proteínas. La diferencia en los tamaños de los genomas eucariotas es un reflejo principalmente de diferencias en las cantidades de ADN no codificante, más que en el número de genes codificantes de proteínas. Algunas de estas secuencias no codificantes de proteínas se sitúan en

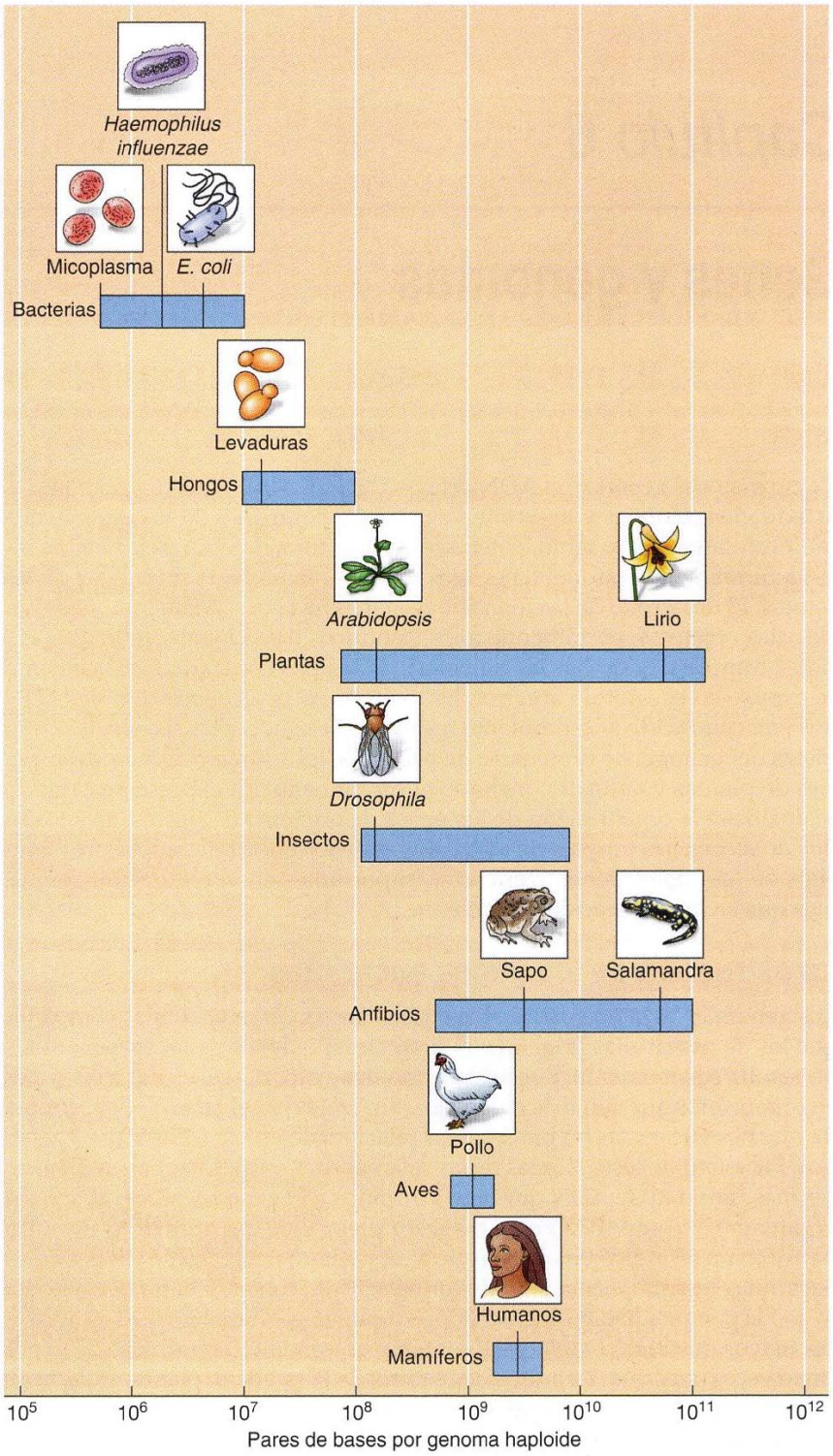


FIGURA 6.1 Tamaño del genoma. La variedad de tamaños de los genomas de los grupos representativos de organismos se muestra en una escala logarítmica.

los genes eucariotas, como se explica más adelante. Otras, que se encuentran entre los genes codificantes de proteínas, se analizan en el siguiente apartado del capítulo. Aunque estas secuencias no codifican proteínas, muchas secuencias no codificantes desempeñan un papel fundamental en las células, lo que incluye la regulación de la expresión génica y la ampliación de forma importante del potencial de codificación de nuestros genomas, al permitir la expresión de los genes de formas alternativas.

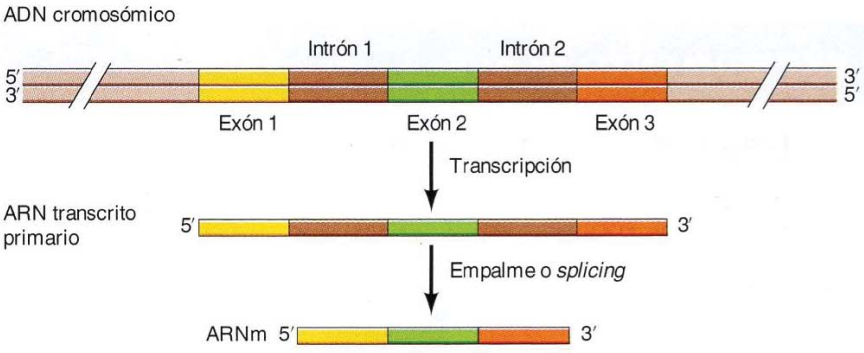


FIGURA 6.2 Estructura de los genes eucariotas. La mayoría de los genes eucariotas contienen segmentos de secuencias codificantes (exones) interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). Los exones e intrones se transcriben para producir un ARN transcrito primario largo. Después los intrones se desprenden mediante *splicing* o empalme para formar el ARNm maduro.

Intrones y exones

En términos moleculares, un **gen** puede definirse como un segmento de ADN que se expresa para dar un producto funcional, que puede ser un ARN (p. ej., ribosómico y transferente) o un polipéptido. Mientras algunos ADN no codificantes en eucariotas representan secuencias de ADN que residen entre genes, la mayor parte de los genes eucariotas incluyen también grandes cantidades de ADN no codificante. Tales genes presentan una estructura dividida en la que los segmentos de secuencia codificante (llamados **exones**) están separados por secuencias no codificantes (secuencias intermedias, o **intrones**) (**Fig. 6.2**). El gen completo se transcribe para producir una molécula larga de ARN en la que los intrones se han retirado mediante *splicing* o empalmes, por lo que solo los exones se encuentran incluidos en el ARNm.

Los intrones se descubrieron por primera vez en 1977, en los laboratorios de Phillip Sharp y Richard Roberts independientemente, durante el estudio de la replicación de los adenovirus en cultivos de células humanas. Los adenovirus resultan ser un modelo útil para el estudio de la expresión génica, debido a que el genoma viral ocupa alrededor de $3{,}5 \times 10^4$ pares de bases y porque los ARNm de los adenovirus se producen a niveles muy altos en las células infectadas. Uno de los métodos para describir los ARNm de los adenovirus consistió en determinar las localizaciones de los correspondientes genes virales mediante el examen de los híbridos de ARN-ADN en el microscopio electrónico. Debido a que los híbridos de ARN-ADN se distinguen de los ADN de una sola hebra, es posible determinar las posiciones de los transcritos de ARN en una molécula de ADN. Sorprendentemente, tales experimentos revelaron que los ARNm de los adenovirus no hibridan con una sola región del ADN viral (**Fig. 6.3**). En su

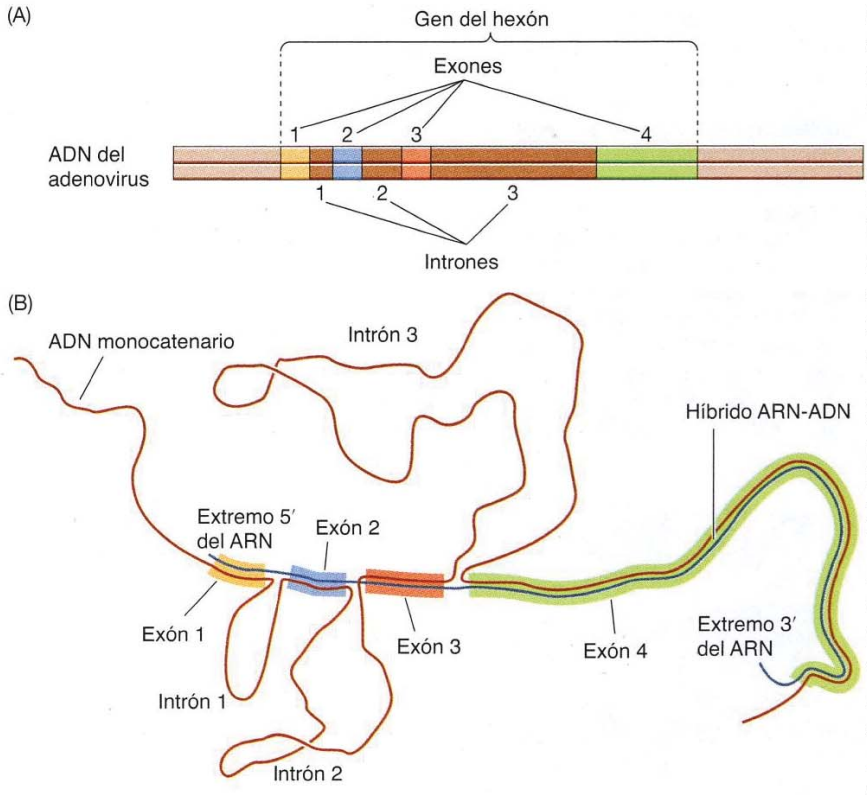


FIGURA 6.3 Identificación de intrones en el ARNm del adenovirus. (A) El gen codificante del hexón adenovirus (una proteína estructural principal de la partícula viral) se compone de cuatro exones, interrumpidos por tres intrones. (B) Este dibujo ilustra a una micrografía electrónica de un híbrido hipotético entre ARNm del hexón y una porción del ADN del adenovirus. Los exones se ven como regiones híbridas de ARN-ADN, que están separadas por lazos de ADN monocatenario correspondientes a los intrones.

EXPERIMENTO CLAVE

Descubrimiento de los intrones

Splicing o empalme de segmentos en el extremo 5' del ARNm tardío del adenovirus 2

Susan M. Berget, Claire Moore y Phillip A. Sharp
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts
Proceedings of the National Academy of Science USA, Volumen 74, 1997, págs. 3171-3175

Phillip Sharp

Richard Roberts

Contexto

Anterior a la clonación molecular, se sabía poco sobre la síntesis del ARNm en las células eucariotas. Sin embargo, estaba claro que el proceso era mucho más complejo en eucariotas que en bacterias. La síntesis de ARNm de eucariotas parece necesitar no solo la transcripción, sino también reacciones de procesamiento que modifican la estructura de los transcritos primarios. Es más, los ARNm eucariotas parecían sintetizarse como transcritos primarios largos, localizados en el núcleo, que luego son escindidos para dar lugar a moléculas de ARNm mucho más cortas que se exportan al citoplasma.

Estos pasos del procesamiento se asumieron como los responsables de la eliminación de las secuencias de los extremos 5′ y 3′ de los transcritos primarios. En este modelo los ARNm embebidos dentro de los transcritos primarios largos estarían codificados por secuencias de ADN no interrumpidas. Esta visión de los ARNm eucariotas cambió radicalmente cuando se descubrió el *splicing* o empalme, de forma independiente, por Berget, Moore y Sharp, y por Louise Chow, Richard Gelinas, Tom Broker y Richard Roberts. (Una organización increíble de secuencia en los extremos 5′ del ARN mensajero del adenovirus 2. *Cell* 12: 1-8, 1977.)

Experimentos

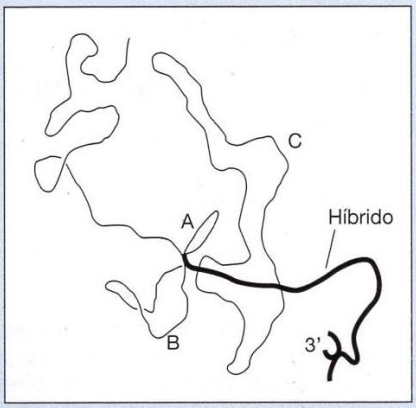
Ambos grupos de investigación que descubrieron el *splicing* o empalme utilizaron el adenovirus 2 para investigar la síntesis del ARNm en las células humanas. La mayor ventaja del virus es que proporciona un modelo que resulta mucho más simple que la célula huésped. El ADN viral se puede aislar directamente de las partículas virales, los ARNm codificadores de las estructuras de proteínas virales están presentes en tal cantidad que pueden ser purificados directamente de las células infectadas. Berget, Moore y Sharp centraron sus experimentos en un ARNm abundante que codifica un polipéptido viral estructural conocido como el hexón.

Para mapear el ARNm del hexón en el genoma viral, se hibridó ARNm puro con ADN de adenovirus, y las moléculas híbridas se examinaron por microscopia óptica. Como se esperaba, el «cuerpo» del ARNm del adenovirus que previamente se había mostrado que contenían el gen del hexón. Sorprendentemente, sin embargo, secuencias en el extremo 5′ del ARNm del hexón fallaron en la hibridación con las secuencias de ADN adyacentes a aquellas codificadoras del «cuerpo» del mensaje, sugiriendo que el extremo 5′ del ARNm había surgido de secuencias localizadas en alguna otra parte del genoma viral.

Esta posibilidad se probó mediante la hibridación del ARNm del hexón con un fragmento de restricción situado *upstream* del gen del hexón. Los híbridos ARNm-ADN formados en este experimento desplegaron una compleja estructura en forma de lazo (véase figura). El «cuerpo» del ARNm formó una larga región híbrida con las secuencias de ADN del hexón previamente identificadas. Notablemente, el extremo 5′ del ARNm del hexón hibridó con tres regiones *upstream* cortas del ADN, que estaban separadas entre ellas y del «cuerpo» del ARNm durante el procesamiento de un transcrito primario largo.

Impacto

El descubrimiento del *splicing* o empalme en el ARNm del adenovirus



Micrografía electrónica y dibujo del ARNm del hexón hibridado con el ADN del adenovirus. Los lazos de hebra única designados con A, B y C corresponden a intrones.

EXPERIMENTO CLAVE

estuvo seguido por experimentos similares con ARNm celulares, demostrando que los genes eucariotas tenían una estructura no esperada. En lugar de ser continuas, sus secuencias codificantes estaban interrumpidas por intrones, que se eliminaban de los transcritos primarios mediante empalme. Ahora se sabe que los intrones representan la mayoría del ADN de los genomas eucariotas, y su papel en la evolución y en la regulación de la expresión génica continúa formando parte de una de las áreas de investigación más activa. El descubrimiento del *splicing* o empalme también estimuló el interés por el mecanismo de esta reacción inesperada en el procesamiento del ARN. Como se discute en el Capítulo 8, estos estudios, no solo han arrojado luz sobre nuevos mecanismos de regulación génica, han revelado también nuevas actividades catalíticas del ARN y proporcionado evidencia crítica para sustentar la hipótesis de que la evolución más temprana estuvo basada en la autorreplicación de las moléculas de ARN. La inesperada estructura del ARNm de los adenovirus ha tenido, por tanto, un impacto esencial en diversas áreas de la biología celular y molecular.

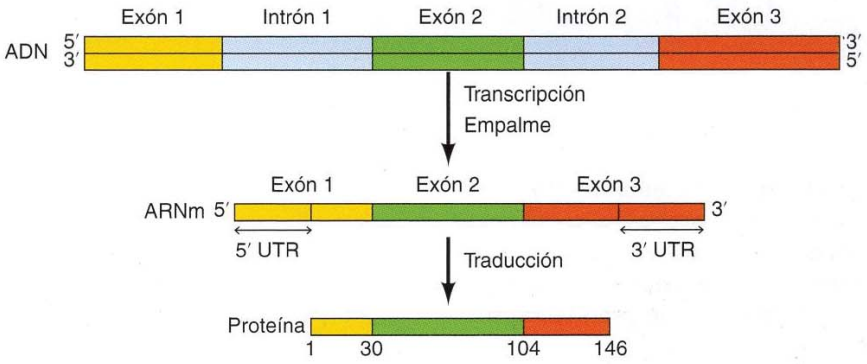


FIGURA 6.4 Gen de la β-globina en el ratón. Este gen contiene dos intrones, que dividen a la región codificadora en tres exones. El exón 1 codifica a los aminoácidos del 1 al 30, el exón 2 codifica aminoácidos del 31 al 104, y el exón 3 codifica a los aminoácidos del 105 al 146. Los exones 1 y 3 también contienen regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5′ y 3′ del ARNm, respectivamente.

lugar, una sola molécula de ARNm hibrida con diversas regiones separadas del genoma viral. Por tanto, el ARNm del adenovirus no corresponde a un transcrito ininterrumpido de la hebra molde de ADN, sino que el ARNm se compone de bloques distintos de secuencias que proceden de diferentes partes del ADN viral. Se demostró que esto se debía al *splicing* o **empalme del ARN**, que se discutirá en detalle en el Capítulo 8.

Poco después del descubrimiento de los intrones en los adenovirus, se hicieron observaciones similares en genes clonados de células eucariotas. Por ejemplo, el análisis por microscopio electrónico de los híbridos de ARN-ADN y de las secuencias de nucleótidos siguientes de los ADN y ADNc clonados indicó que la región codificante del gen de la β-globina del ratón (que codifica la subunidad β de la hemoglobina) está interrumpida por dos intrones que se retiran del ARNm mediante empalme o *splicing* (**Fig. 6.4**).

La estructura intrón-exón de muchos genes eucariotas es complicada, siendo la cantidad de ADN en las secuencias de los intrones con frecuencia más grandes que la de los exones. Por ejemplo, un gen humano medio contiene aproximadamente 10 exones (total 4,3 kb), interrumpidos por intrones (total 52 kb) resultando en aproximadamente 56.000 pares de bases (56 **kilobases** o **kb**) de ADN genómico (**Tabla 6.1**). Los exones incluyen regiones de

TABLA 6.1 Características del gen humano medio[a]

Número de exones	10
Secuencia codificante	1.700 pares de bases
Secuencia total de exones	4.300 pares de bases
Secuencia intrónica	52.000 pares de bases

[a] Datos extraídos de The ENCODE Project Consortium. 2012. *Nature* 489:57.

TABLA 6.2 Resumen de los genomas

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)[a]	Número de genes	Secuencia codificada de proteínas	Secuencia intrónica	Intrones por gen
Bacteria					
E. coli	4,6	4.288	88%	NS[b]	NS
Levaduras					
S. cerevisiae	12	6.000	70%	1%	0,04
Invertebrados					
C. elegans	97	19.000	25%	25%	5
Drosophila	180	13.600	13%	10%	4
Plantas					
Arabidopsis thaliana	125	26.000	25%	25%	5
Mamíferos					
Humano	3.200	21.000	1,2%	35%	9

[a] Mb = Millones de pares de base.
[b] NS = No significativo.

los extremos 5′y 3′ del ARNm que no se traducen en proteínas (regiones **3′** y **5′** no traducidas o **UTR: *untranslated regions***). Estos exones no codificantes tienen en promedio unas 2,6 kb y una secuencia codificante de proteínas de aproximadamente 1,7 kb por gen. Así pues, las secuencias codificantes de proteínas suponen sólo en torno al 3% y los intrones comprenden aproximadamente el 93% del gen humano medio.

Los intrones están presentes en la mayoría de los genes de organismos eucariotas complejos, aunque no son universales. Por ejemplo, casi la totalidad de los genes de histonas carecen de intrones, con lo cual está claro que los intrones no son necesarios para la función génica en las células eucariotas. En cambio, los intrones están presentes sólo en genes raros de los organismos procariotas, cuyos genomas consisten casi enteramente (cerca del 90%) en secuencias codificantes de proteínas. Debe observarse que muchos intrones se conservan en los genes de las plantas y los animales, lo que indica que aparecieron en momentos tempranos de la evolución, antes de la divergencia entre estos dos tipos de organismos.

En los eucariotas, la frecuencia de los intrones aumenta con el tamaño y la complejidad del genoma (**Tabla. 6.2**). Por ejemplo, los intrones están presentes en sólo el 4%, aproximadamente, de los genes de la levadura *S. cerevisiae*, que consiste en 12×10^6 pares de bases y contiene en torno a 6.000 genes codificantes de proteínas. Por otra parte, estos genes de *S. cerevisiae* que no contienen intrones suelen tener un único intrón de pequeño tamaño cerca del inicio del gen. Así, las levaduras poseen genomas compactos, similares a los procariotas, con secuencias codificantes de proteínas que suponen aproximadamente el 70% del ADN total de la levadura. Por el contrario, los genomas de *C. elegans*, *Drosophila* y *Arabidopsis*, que tienen un tamaño intermedio entre los genomas de las levaduras y los seres humanos (unos 100×10^6 pares de bases), contienen también números intermedios de intrones. Cada uno de estos organismos posee una media de 4-5 intrones por gen, y la cantidad de la secuencia de intrones es similar a la de la secuencia codificante de proteínas. Así, el gen promedio en estos organismos contiene aproximadamente el 50% de secuencias de intrones y el 50% de secuencias de exones, donde los intrones suponen en torno al 15-25% de sus genomas. Como se ha indicado anteriormente, el gen humano medio incluye aproximadamente el 90% de secuencias de intrones y el 10% de exones, y los intrones suponen en torno al 35% del genoma.

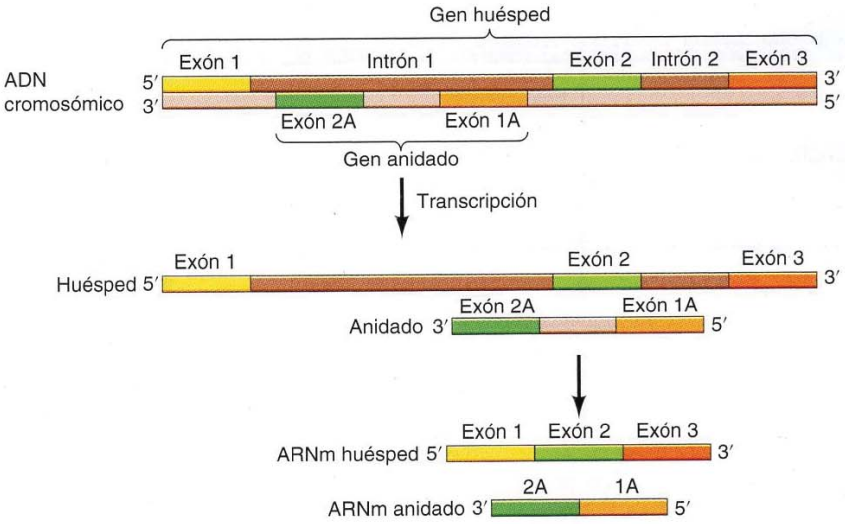


FIGURA 6.5 Genes anidados. Un gen anidado está contenido dentro de un intrón de un gen huésped de mayor tamaño. La transcripción produce transcripciones primarias de los genes del huésped y anidados, que se empalman para producir ARNm del gen del huésped y el gen anidado.

Función de los intrones

Aunque los intrones se separan de los ARNm completos, tienen otras muchas funciones biológicas importantes. En primer lugar, muchos intrones codifican en realidad productos funcionales, que pueden ser proteínas o ARN no codificantes. En estos casos (llamados genes anidados), un gen está contenido dentro de un intrón de un gen más grande (**Fig. 6.5**). Estos genes anidados, con proteínas codificadas por intrones de un gen mayor, fueron identificados por primera vez en *Drosophila*, donde suponen más del 5% del número total de genes codificantes de proteínas. En el genoma humano, los genes anidados son menos frecuentes; se han identificado unos 150 de estos genes anidados codificantes de proteínas, que suponen menos del 1% del total. Algunos genes anidados de *Drosophila* y del genoma humano codifican también pseudogenes o ARN no codificantes, lo que incluye ARNm y pequeños ARN nucleolares que actúan en el procesamiento del ARN ribosómico (como se verá en el siguiente apartado).

Los intrones contienen asimismo secuencias reguladoras que controlan la expresión génica, fundamental para el comportamiento celular. Dado que todas las células de un organismo contienen los mismos genes, las diferencias reguladas en la expresión génica determinan la diferencia entre un tipo de célula y otro; por ejemplo, entre una célula humana del encéfalo y una célula muscular. El primer paso en la expresión génica, la transcripción, es regulado por secuencias que pueden residir en diversas posiciones; en la dirección 5′ de los genes, en posiciones distantes en el genoma o dentro de los genes (**Fig. 6.6**). La mayor parte de las secuencias reguladoras transcripcionales que se encuentran dentro de los genes están situadas en el primer intrón del gen o en la región 5′ no traducida codificada por el primer exón. Los estudios globales indican que aproximadamente el 10%-20% del genoma humano consiste en secuencias que actúan para regular la expresión génica, como se analizará en el Capítulo 8.

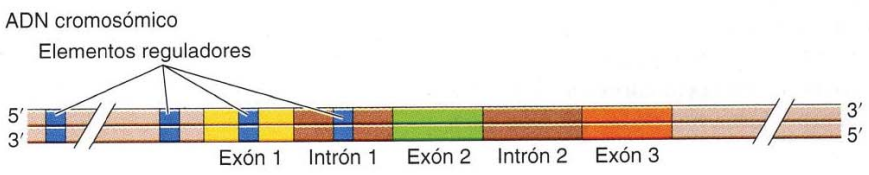


FIGURA 6.6 Elementos reguladores transcripcionales. Los elementos reguladores que controlan la transcripción de un gen pueden estar situados hasta a cientos de kilobases de distancia del gen, inmediatamente en la dirección 5′ del gen, dentro de exones no codificantes o de intrones.

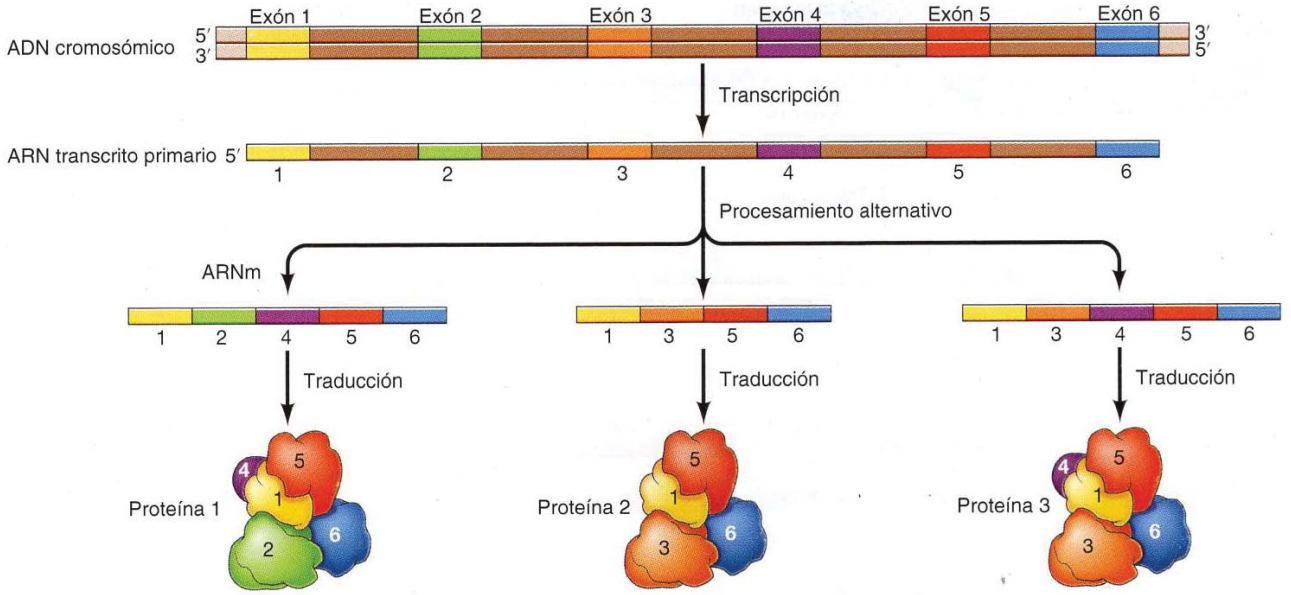
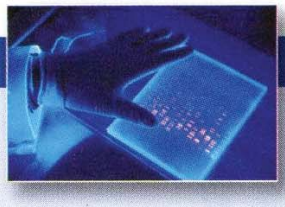


FIGURA 6.7 Procesamiento alternativo. El gen ilustrado contiene seis exones, separados por cinco intrones. El procesamiento alternativo permite que estos exones se unan en diferentes combinaciones, resultando en la formación de tres ARNm y proteínas diferentes a partir de un solo transcrito primario.

Además de contener las secuencias que regulan la transcripción, las secuencias de los intrones regulan el *splicing*, que es fundamental en la formación de ARNm funcionales. Muy notablemente, la presencia de intrones hace posible que los exones de un gen se unan en diferentes combinaciones, lo que da lugar a la síntesis de diferentes proteínas del mismo gen. Este proceso, denominado ***splicing* alternativo** (**Fig. 6.7**), tiene lugar frecuentemente en los genes de los organismos eucariotas complejos. Por ejemplo, la mayoría de los genes humanos pueden empalmarse alternativamente para producir entre dos y varios miles de ARNm diferentes. En promedio, cada gen humano produce 6 ARNm empalmados alternativamente, 4 de los cuales codifican diferentes proteínas. Así, el *splicing* alternativo permite que 21.000 genes codificantes de proteínas humanos especifiquen casi 85.000 proteínas diferentes, lo que extiende sustancialmente el repertorio funcional del genoma humano.

Secuencias no codificantes

Los genes codificantes de proteínas, incluidos sus intrones, suponen aproximadamente el 36% del genoma humano. El resto del genoma humano, así como los genomas de otros eucariotas, está compuesto por varios tipos adicionales de secuencias. Aunque estas secuencias no codifican proteínas, las investigaciones recientes han establecido que no están exentas de funcionalidad. Si bien el papel y las actividades de estas secuencias no se comprenden todavía completamente, al parecer muchas tienen cometidos importantes en la regulación génica. Otros han sido fundamentales en la evolución de los cromosomas eucariotas, y otros más intervienen en la estructura y replicación de cromosomas de eucariotas. La complejidad de los genomas de los eucariotas superiores se refleja más claramente en la extensión y las múltiples actividades de estas secuencias no codificantes que en el número de genes codificantes de proteínas, con lo que es probable que la comprensión de las funciones de las secuencias no codificantes será fundamental para entender el desarrollo y el comportamiento de las plantas y los animales superiores.



EXPERIMENTO CLAVE

El proyecto ENCODE

Una enciclopedia integrada de elementos ADN en el Genoma Humano
The ENCODE Project Consortium
Nature, Volumen 489, 2012, 57–73

Contexto

Un resultado sorprendente de la secuencia del genoma humano publicado en 2004 (véase el experimento clave del Capítulo 5) fue el pequeño número de genes codificantes de proteínas, estimados en aquel momento en aproximadamente 20.000-25.000. Las secuencias codificantes de proteínas suponían menos del 1,5% del genoma, con lo cual cabía preguntarse para qué servía el resto del ADN. Los primeros análisis de nuestro genoma, de los años ochenta, suponían que la mayor parte del ADN que no codificaba proteínas era no funcional. Según este enfoque, una parte sustancial del genoma se consideró «ADN basura». Sin embargo, esta visión fue cuestionada con argumentos que defendían que las secuencias no codificantes de proteínas podían desempeñar otros cometidos importantes en la célula. El proyecto ENCODE se puso en marcha en 2003 con el objetivo de definir la totalidad de los elementos funcionales del genoma humano. ¿Qué cantidad de nuestro genoma era realmente «ADN basura» no funcional y cuánta podría tener funciones importantes distintas de la codificación de proteínas, por ejemplo en la regulación génica? Los resultados de ENCODE han sugerido que la inmensa mayoría de nuestro genoma es funcional y esta conclusión ha modificado nuestra visión de los genomas de los mamíferos, en particular en lo que respecta a la prevalencia de los ARN no codificantes.

Experimentos

La primera fase de ENCODE, iniciada en 2003, fue un proyecto piloto para analizar el 1% del genoma. Los resultados de esta fase inicial, publicados en 2007, revelaron la viabilidad del enfoque. Los avances en la secuenciación de ADN, en particular el desarrollo de tecnologías de secuenciación de la siguiente generación (abordadas en el Capítulo 5), permitieron aumentar la escala del proyecto hasta el análisis del genoma completo. Esta fase de ENCODE ha consistido en una inmensa colaboración internacional, en la que tomaron parte más de 400 científicos de 32 instituciones de todo el mundo. Utilizaron varios métodos diferentes para analizar la transcripción y las secuencias de regulación de genes en todo el genoma en 147 líneas celulares humanas diferentes. La transcripción y el procesamiento del ARN se caracterizaron por ARN-seq, y las secuencias reguladoras de genes se analizaron mediante la determinación de los sitios de unión para proteínas de regulación génica y la identificación de regiones de cromatina características de las secuencias reguladoras. Dado que los diferentes genes se expresan en células también distintas, los resultados obtenidos con las 147 líneas celulares se integraron para determinar la extensión completa de las secuencias transcritas y reguladoras en el genoma humano.

En la tabla se resumen algunos de los resultados del proyecto ENCODE. El hallazgo más importante fue que casi la totalidad de nuestro genoma, al menos el 80%, tiene una función que podría caracterizarse por este análisis genómico. Una fracción inesperadamente elevada del genoma, en torno al 75%, se transcribió en ARN. En ello se incluían transcripciones obtenidas de los 20.687 genes codificadores de proteínas identificados por ENCODE, así como 8.801 ARN cortos no codificantes, 9.640 ARN largos no codificantes (ARNlnc) y transcritos de 863 pseudogenes. Las regiones de ADN que se unieron a factores de transcripción comprendieron el 8,1% del genoma. Sin embargo, en estos experimentos se incluyó un número limitado de factores de transcripción y muchos tipos de células diferenciados no estaban representados entre las 147 líneas celulares estudiadas, con lo cual se supone que el resultado está infravalorado y corresponde a aproximadamente la cantidad total de la secuencia del genoma que funciona como sitios de unión para proteínas reguladoras de la expresión génica.

Impacto

El resultado más sorprendente de ENCODE es la magnitud en la que nuestro genoma es funcional, al menos en lo que se refiere a actividad bioquímica. Especialmente inesperada es la magnitud de la transcripción de ARN no codificantes y el hallazgo de un gran número de genes que codifican ARNlnc. Estos resultados han modificado la forma en que contemplamos nuestro genoma. En lugar de verlo como un pequeño número de secuencias codificantes de proteínas integradas en el inmenso exceso de «ADN basura» funcional, hoy parece que la mayoría de nuestro genoma consiste en secuencias funcionales, con cometidos abundantes para los ARN no codificantes y las secuencias de regulación de genes.

La comprensión de las funciones del gran número de ARN no codificantes identificados por ENCODE sigue siendo un reto para las investigaciones futuras. En muchos casos se ha constatado que actúan como reguladores de la transcripción génica, pero las funciones de la mayoría de estas transcripciones todavía no se han determinado. Por tanto, la medida en la que representan verdaderamente elementos biológicamente funcionales, así como una comprensión más completa de sus funciones en el comportamiento celular, permanecen sin respuesta. Análogamente, la determinación completa de las secuencias reguladoras de los genes en nuestro genoma se mantiene como un objetivo de las investigaciones futuras, que exigirá el análisis de un número todavía más elevado de tipos celulares representativos de la extensión completa de células diferenciadas. Aunque aún quedan bastantes incógnitas por resolver, ENCODE ha asentado los cimientos de una nueva forma de contemplar los genes y los genomas de los mamíferos.

Resumen de los resultados de ENCODE

Genes codificantes de proteínas	20.687
ARN cortos no codificantes	8801
ARN largos no codificantes	9640
Pseudogenes	11.224
Porcentaje de genoma transcrito en ARNt	74,7%
Porcentaje de factores de transcripción de unión al genoma	8,1%

ARN no codificantes

Un avance importante de nuestro conocimiento sobre los elementos funcionales del genoma humano se obtuvo en 2012 mediante el proyecto a gran escala denominado ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements, o enciclopedia de elementos de ADN). El objetivo del proyecto ENCODE era definir las funciones de los diferentes tipos de secuencias del genoma humano. Supone el análisis de 147 líneas celulares humanas diferentes con el uso de diversos métodos, entre ellos la secuenciación de ARN a gran escala (ARN-seq; véase Fig. 5.7) para caracterizar todas las secuencias que fueron transcritas en ARN. Un resultado inesperado de este extenso análisis fue que se transcribió aproximadamente el 75% del genoma humano. Este porcentaje es muy superior al genoma que puede obtenerse mediante los genes codificantes de proteínas, y tales hallazgos han conducido a la comprensión de las extensas funciones que tienen los ARN no codificantes en la regulación génica. Algunos ARN no codificantes, como los ARN de transferencia (ARNt) y los ARN ribosómicos (ARNr), se conocen desde hace tiempo y desempeñan funciones fundamentales en la síntesis de proteínas (abordada en el Capítulo 4). Otros ARN no codificantes funcionan en el *splicing* de los pre-ARNm y en el procesamiento de ARN ribosómicos, todo lo cual se desarrollará en los siguientes capítulos. Es importante señalar que recientemente se han descubierto dos tipos de ARN no codificantes y algunos de los avances más estimulantes de los últimos años han procedido de la comprensión de su importancia en la regulación génica. Los resultados de ENCODE sugieren que la extensión en la cual los ARN no codificantes regulan la expresión génica puede ser muy superior a lo que se había contemplado anteriormente.

Tal como se expuso en el Capítulo 4, la **interferencia de ARN** (iARN) mediada por ARN de doble hebra cortos se ha utilizado ampliamente como una herramienta experimental para bloquear la expresión génica en el nivel de traducción desde su descubrimiento en 1998 (véase Fig. 4.38). La regulación de la traducción por ARN de doble hebra cortos no sólo es un importante método experimental, sino que además es utilizada normalmente por las células para controlar la traducción y la degradación de ARNm. Los ARN no codificantes endógenos que median en la interferencia de ARN son **microARN (ARNmi),** que tienen aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Puede haber hasta 1.000 ARNmi codificados en el genoma humano, algunos de los cuales se

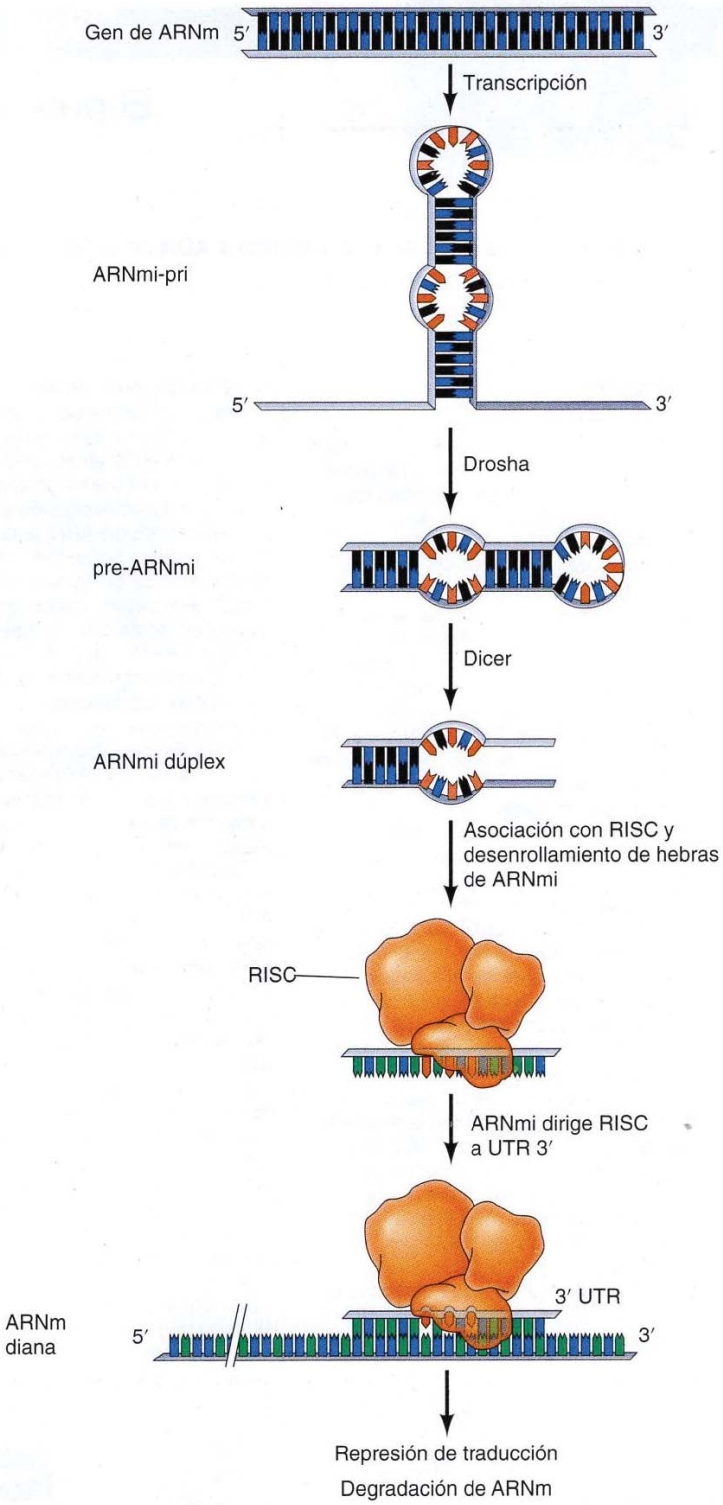


FIGURA 6.8 ARNmi. Los genes de ARNmi son transcritos para producir transcripciones primarias (ARNmi-pri) que contienen estructuras en horquilla. Los ARNmi-pri son escindidos secuencialmente por las nucleasas Drosha y Dicer para producir ARNmi de doble hebra de aproximadamente 22 nucleótidos. Los ARNmi se asocian con el complejo RISC, en el que se arrollan las dos hebras del ARNmi. El ARNmi dirige después el RISC a la región 3' no traducida (UTR) de un ARNm diana, para conducir a la represión de la traducción y la degradación de ARNm.

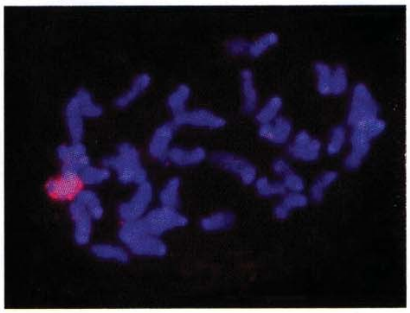


FIGURA 6.9 Inactivación del cromosoma X. El cromosoma X inactivo está recubierto e inactivado por el *Xist* del ARNlnc (rojo). Los cromosomas están teñidos por un colorante que se une al ADN (azul). (De J. T. Lee, 2009. *Genes Dev.* 23: 1831).

encuentran en intrones de genes codificantes. Los precursores de ARNmi son ARN más largos que se pliegan en estructuras en horquilla, las cuales se escinden en secuencia por la acción de las nucleasas Drosha y Dicer para producir ARN de doble hebra de 22 nucleótidos aproximadamente (**Fig. 6.8**). Una hebra de un ARNmi se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), y el ARNmi dirige el RISC a ARN complementarios, donde inhiben la traducción y estimulan la degradación del ARNm. Se estima que cada ARNmi puede dirigir hasta 100 ARNm diferentes, de manera que la mitad de nuestros genes codificantes de proteínas pueden ser dianas de la regulación por ARNmi. Aunque sus funciones biológicas no se comprenden enteramente, se ha descubierto que los ARNmi actúan en diversos procesos de desarrollo, incluido el de los embriones en sus primeras fases, el sistema nervioso, el músculo, el corazón, los pulmones y el sistema inmunitario. Se ha mostrado también que los ARNmi regulan la proliferación y supervivencia celular, y se ha descubierto que la expresión anómala de ARNmi contribuye a las cardiopatías y a varias formas de cáncer.

Además de los ARNmi, los **ARN largos no codificantes (ARNlnc)**, que son ARN no codificantes de más de 200 nucleótidos, se han reconocido recientemente como importantes reguladores de la expresión génica en células eucariotas. El fenómeno de la **inactivación del cromosoma X** aporta uno de los primeros ejemplos del papel de un ARNlnc. En muchos animales, incluidos los seres humanos, las hembras tienen dos cromosomas X y los machos, un cromosoma X y uno Y. El cromosoma X contiene aproximadamente 1.000 genes que no están presentes en el Y, mucho más pequeño. Así, las hembras tienen el doble de copias de la mayor parte de los genes del cromosoma X que los machos. A pesar de esta diferencia, las células de los machos y las hembras contienen las mismas cantidades de proteínas codificadas por la mayoría de los genes del cromosoma X. En consecuencia, se produce un mecanismo de compensación de dosificación en el que la mayor parte de los genes de uno de los dos cromosomas X en las células femeninas se silencia pronto en el desarrollo. Por lo tanto, para la transcripción, tanto en los machos como en las hembras, se dispone solamente de una copia de la mayor parte de los genes presentes en el cromosoma X. El elemento clave en la inactivación del cromosoma X es un ARNlnc denominado *Xist*, que tiene una longitud de 17 kb. El ARN de *Xist* se une al X inactivo y bloquea su transcripción (**Fig. 6.9**).

Aunque antes se conocían algunos ejemplos de *Xist*, la magnitud en la que se expresan los ARNlnc en las células de mamíferos fue reconocida a raíz del proyecto ENCODE a gran escala, que reveló la extensa transcripción de genomas de mamíferos. La más reciente secuenciación de alto rendimiento de ARN celulares humanos ha identificado más de 50.000 ARNlnc, que son los productos de distintas unidades de transcripción situadas fuera de los genes codificantes de proteínas. Estudios recientes han encontrado que muchos ARNlnc (como *Xist*) pueden ser reguladores funcionales de la expresión génica, como se verá en el Capítulo 8. ENCODE ha identificado también transcritos de casi 9.000 ARN no codificantes pequeños, donde las funciones de la mayor parte de los mismos aún deben determinarse. Es especialmente interesante mencionar que el número de ARN no codificantes que se han identificado actualmente en las células humanas es mayor que el de genes codificantes de proteínas, lo que sugiere que estos ARN no codificantes pueden contribuir considerablemente a la complejidad biológica de los organismos eucariotas superiores.

Secuencias de ADN repetitivas

Una gran parte de los genomas eucariotas complejos consiste en secuencias altamente repetidas, secuencias de ADN, de las que puede haber cientos de

TABLA 6.3 Secuencias repetitivas en el genoma humano

Tipo de secuencia	Número de copias	Fracción del genoma
Repeticiones de secuencia sencilla[a]	>1.000.000	~10%
Retrotransposones		
LINE	850.000	21%
SINE	1.500.000	13%
Elementos de tipos retrovirus	450.000	8%
Transposones de ADN	300.000	3%

[a] El contenido de repeticiones de secuencia sencilla se estima a partir de la fracción de heterocromatina presente en el genoma humano.

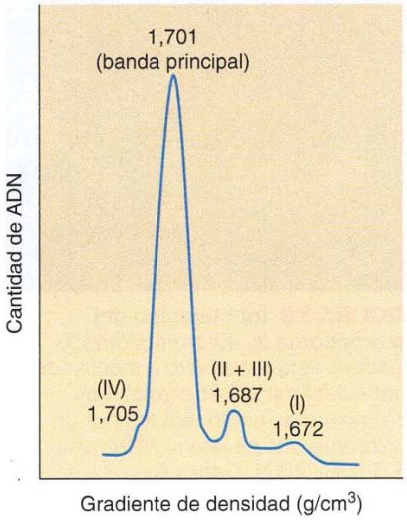


FIGURA 6.10 ADN satélite. La centrifugación de equilibrio del ADN de *Drosophila* en un gradiente de CsCl separa los ADN satélites (designados I-IV) con densidades en el gradiente (en g/cm³) de 1,672, 1,687, y 1,705 de la banda principal del ADN genómico (con una densidad en el gradiente de 1,701).

miles de copias por genoma. Hay varios tipos de estas secuencias altamente repetidas (**Tabla 6.3**). Una clase (denominada **repeticiones de secuencia simple**) consiste en conjuntos en tándem formados por miles de copias de secuencias cortas, que oscilan entre 1 y 500 nucleótidos. Por ejemplo, un tipo de repetición de secuencia simple de *Drosophila* está compuesto por repeticiones en tándem de la unidad de 7 nucleótidos ACAAACT. Gracias a su composición de bases diferenciada, es posible separar muchos ADN de secuencia simple del resto de ADN genómico mediante la centrifugación en equilibrio en gradientes de densidad de CsCl. La densidad del ADN está determinada por su composición de bases: las secuencias abundantes en AT son menos densas que las ricas en GC (la masa molecular de un par de bases GC es un dalton mayor que la de un par de bases AT). Por tanto, un ADN de secuencia simple abundante en AT da lugar a bandas en gradientes de CsCl a una densidad menor que la mayor parte del ADN genómico de *Drosophila* (**Fig. 6.10**). Como esos ADN de secuencias repetitivas dan lugar a bandas en forma de «satélites» separadas de la banda principal de ADN, a menudo se los denomina **ADN satélite.** Estas secuencias se repiten millones de veces en cada genoma, y representan cercan del 40% del ADN genómico total en *Drosophila* y aproximadamente el 10% en los seres humanos.. Los ADN de secuencia simple no se transcriben ni contienen información genética funcional. Sin embargo, algunos son muy importantes para la estructura del cromosoma, como se describe más adelante.

Otras secuencias repetitivas de ADN se encuentran dispersas a través del genoma en lugar de agrupadas en repeticiones en tándem. Estos elementos repetitivos dispersos son un contribuyente muy importante para el tamaño del genoma, constituyendo aproximadamente el 45% del ADN genómico humano (véase Tabla 6.3). Las dos clases más predominantes de estas secuencias se denominan **short interspersed elements** (SINE) y **long interspersed elements** (LINE). Los SINE poseen una longitud de 100 a 300 pares de bases. Unos 1,5 millones de estas secuencias se encuentran dispersadas a través del genoma, constituyendo aproximadamente un 13% del ADN humano total. Aunque los SINE se transcriben a ARN, no codifican proteínas y su función es desconocida. Los LINE humanos principales poseen una longitud de 4-6 kb, aunque muchas de las secuencias repetidas derivadas de LINE son más cortas, con un tamaño aproximado de 1 kb. Existen aproximadamente 850.000 repeticiones de secuencias LINE en el genoma, constituyendo el 21% del ADN humano.

Tanto las secuencias SINE como LINE son ejemplos de **elementos transponibles**, que son capaces de moverse a puntos distintos en el ADN genómico. Tanto las secuencias SINE como LINE son **retrotransposones**, lo que

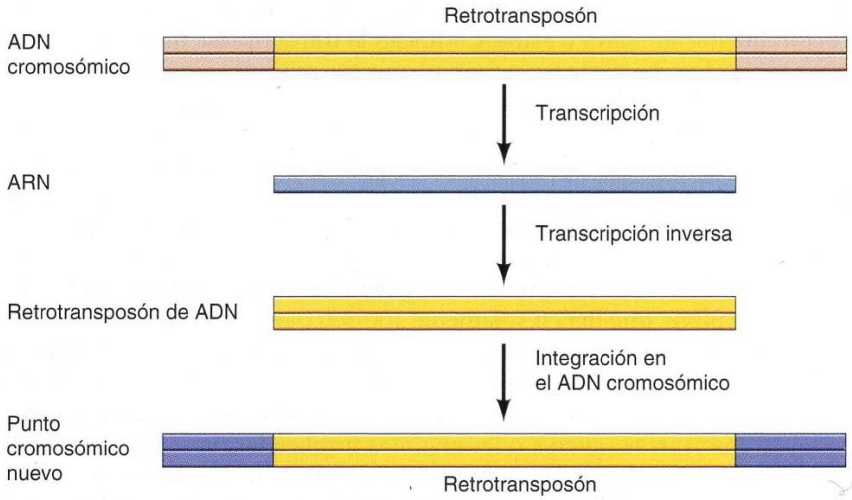


FIGURA 6.11 Movimiento de retrotransposones. Un retrotransposón presente en un punto del ADN cromosómico se transcribe en ARN, y a continuación es convertido de nuevo en ADN mediante transcripción inversa. El retrotransposón de ADN puede a continuación integrarse en un nuevo punto cromosómico.

significa que su transposición está mediada por la transcripción inversa (**Fig. 6.11**). Un ARN copia de una secuencia SINE o LINE es convertido en ADN por la transcriptasa inversa en el interior celular, y la nueva copia de ADN se integra en un nuevo punto del genoma. Una tercera clase de secuencias repetitivas dispersas, que se asemejan fuertemente a los retrovirus, se denominan **elementos semejantes a retrovirus** y también se mueven dentro del genoma por transcripción inversa. Los elementos semejantes a retrovirus humanos varían desde aproximadamente 2-10 kb de longitud. Existen aproximadamente 450.000 elementos semejantes a retrovirus en el genoma humano, lo que constituye aproximadamente un 8% de ADN humano. Por el contrario, la cuarta clase de elementos repetitivos dispersos (**transposones de ADN**) se mueven por el genoma siendo copiados y reinsertados como secuencias de ADN, en lugar de moverse mediante transcripción inversa. En el genoma humano existen unas 300.000 copias de transposones de ADN, variando desde 80 a 3.000 pares de bases de longitud y constituyendo aproximadamente un 3% del ADN humano.

Nuestra comprensión de los retrotransposones, que suponen aproximadamente el 42% del genoma humano, procede de estudios sobre retrovirus. Como se expone en el Capítulo 4, los retrovirus (por ejemplo, VIH) contienen genomas de ARN en sus partículas de virus pero se replican a través de la síntesis de un provirus de ADN en células infectadas (véase Fig. 4.13). El provirus es sintetizado por la enzima transcriptasa inversa y se integra en el ADN cromosómico de células infectadas por una enzima vírica denominada integrasa. El ciclo vital vírico prosigue con la transcripción del provirus, que produce ARN genómico vírico así como ARNm que dirigen la síntesis de proteínas víricas (como la transcriptasa inversa y la integrasa). El ARN genómico se empaqueta seguidamente en partículas víricas, que son liberadas desde la célula huésped. Estos virus de progenie pueden infectar una nueva célula, para iniciar otra tanda de síntesis e integración de ADN provírico. El efecto neto puede verse como el movimiento del provirus desde un sitio cromosómico a otro, a través de la síntesis y la transcripción inversa de un producto intermedio de ARN.

Algunos retrotransposones, como los elementos de tipo retrovirus, son estructuralmente similares a éstos. Codifican la transcriptasa inversa y la integrasa y pueden desplazarse a nuevos puntos cromosómicos dentro de la misma célula por medio de mecanismos similares a los que intervienen en la replicación de retrovirus. Sin embargo, los elementos de tipo retrovirus difieren de los retrovirus en que no se empaquetan en partículas infecciosas y, por tanto, no pueden difundirse de una célula a otra. Los LINE codifican de forma similar la transcriptasa inversa y una enzima que interviene en su integración en el ADN celular, aunque el mecanismo detallado de su transposición es diferente al de los retrovirus y los elementos similares a ellos. En cambio, los SINE, que tienen solamente 100-300 pares de bases, no codifican la transcriptasa inversa u otras proteínas. Surgen por transcripción inversa de ARN pequeños, entre ellos los ARNt y los pequeños ARN citoplasmáticos que intervienen en el transporte de proteínas. Dado que no incluyen genes para la transcriptasa inversa o las enzimas implicadas en la integración de ADN, su transposición implica presumiblemente la acción de transcriptasas inversas y enzimas de integración que se codifican en otro lugar del genoma, probablemente por la acción de otros retrotransposones como los LINE.

◆ Muchas de las alteraciones genéticas responsables de las enfermedades hereditarias pueden deberse a mutaciones en regiones no codificantes funcionales, más que en secuencias de codificación de proteínas.

Aunque los altamente repetitivos SINE y LINE suponen una fracción importante del ADN genómico, sus transposiciones en puntos aleatorios en el genoma no son probablemente de utilidad para la célula en la que se encuentran. Estos transposones inducen mutaciones cuando se integran en un nuevo sitio diana y, al igual que las mutaciones inducidas por otros agentes, la mayor parte de las resultantes de la integración de transposones serán probablemente perjudiciales para la célula. Las mutaciones que proceden de la transposición de LINE y SINE se han asociado con varias enfermedades humanas hereditarias, como hemofilia, fibrosis quística, distrofia muscular y algunos cánceres hereditarios. Los estudios recientes del genoma de cánceres humanos han encontrado que la transposición de los LINE y los SINE se produce frecuentemente durante el desarrollo de varios tipos de cánceres no hereditarios. Muchos de los transposones identificados en estos cánceres afectaban a genes que intervienen en el desarrollo del cáncer, lo que sugiere que la mutación de estos genes por los retrotransposones puede haber contribuido a la enfermedad.

Por otra parte, algunas mutaciones resultantes del movimiento de elementos susceptibles de transposición pueden ser beneficiosas y contribuir de forma positiva a la evolución de las especies. Por ejemplo, se ha encontrado que algunos retrotransposones en los genomas de mamíferos contienen secuencias reguladoras que controlan la expresión de genes adyacentes, con lo cual sus movimientos han contribuido a los cambios evolutivos en la expresión génica. Por otra parte, frecuentemente durante el proceso de transposición se transportan secuencias de ADN celular adyacente a LINE. En consecuencia, la transposición de los LINE puede producir el movimiento de secuencias de ADN celulares a nuevos lugares del genoma. Dado que los LINE pueden integrarse en genes activos, la transposición asociada de secuencias de ADN celular puede llevar a la formación de nuevas combinaciones de secuencias reguladoras y/o codificantes y contribuir directamente a la evolución de nuevos genes.

Además de los efectos de su transposición, los retrotransposones han desempeñado una función importante en la modelación del genoma al estimular las reordenaciones de ADN resultantes de la recombinación entre secuencias repetitivas (**Fig. 6.12**). Por ejemplo, las reordenaciones de ADN cromosómico resultante de la recombinación entre LINE integrados en diferentes puntos del genoma puede llevar a la formación de nuevos genes. Los elementos susceptibles de transposición han desempeñado un papel importante en la estimulación de las reordenaciones génicas que han contribuido

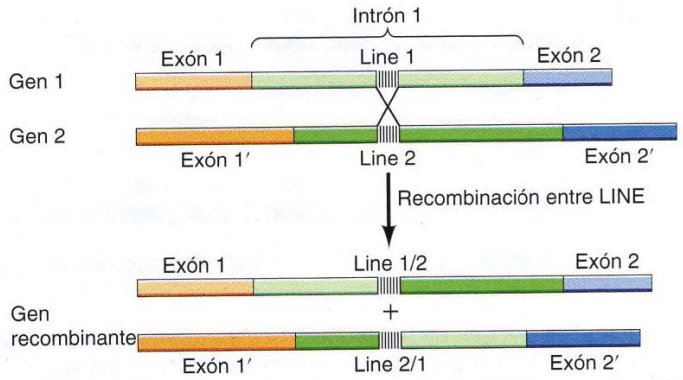


FIGURA 6.12 Recombinación entre secuencias repetitivas. La recombinación entre secuencias repetitivas en diferentes posiciones del genoma puede conducir a reordenaciones génicas. En el ejemplo mostrado, las secuencias repetitivas están situadas dentro de intrones, con lo cual la recombinación produce una reordenación de las secuencias codificantes de proteínas de dos genes diferentes.

a la generación de diversidad genética, y de este modo han tenido un papel fundamental en la conformación de nuestros genomas.

También cabe mencionar que los elementos de transposición están presentes en las secuencias de la mayoría de los ARNlnc. Por otra parte, las secuencias de SINE de algunos ARNlnc contribuyen directamente a sus funciones en la regulación génica, lo cual sugiere que los elementos susceptibles de transposición de los ARNlnc pueden asumir funciones generales en la regulación génica.

Duplicación génica y pseudogenes

Otro de los factores que favorecen al gran tamaño de los genomas eucariotas es que algunos genes están presentes en múltiples copias, algunas de las cuales frecuentemente son afuncionales. En algunos casos, múltiples copias de genes son necesarias para producir ARN o proteínas requeridas en grandes cantidades, como los ARN ribosómicos o las histonas. En otros casos, miembros concretos de un grupo de genes relacionados (denominado una **familia génica**) pueden ser transcritos en diferentes tejidos o en diferentes etapas del desarrollo. Por ejemplo, las subunidades α y β de la hemoglobina se encuentran codificadas por familias de genes en el genoma humano, con diferentes miembros de esa familia expresados en el tejido embrionario, fetal y tejidos adultos (**Fig. 6.13**). Los miembros de muchas familias de genes (p. ej., los genes de la globina) se agrupan en una región del ADN; los miembros de otras familias están dispersos en cromosomas diferentes.

Las familias de genes se cree que han surgido de la duplicación de un gen ancestral original, divergiendo los diferentes miembros de una familia como consecuencia de mutaciones durante la evolución. Tal divergencia puede desembocar en la evolución de proteínas relacionadas capaces de funcionar en tejidos diferentes o en diferentes etapas del desarrollo. Por ejemplo, las globinas fetales presentan una mayor afinidad para el O_2 que las globinas adultas —una diferencia que permite al feto obtener O_2 de la circulación materna.

Como cabría esperar, sin embargo, no todas las mutaciones favorecen la función del gen. Algunas copias genéticas presentan mutaciones sustanciales que ocasionan la pérdida de la capacidad para producir un producto ge-

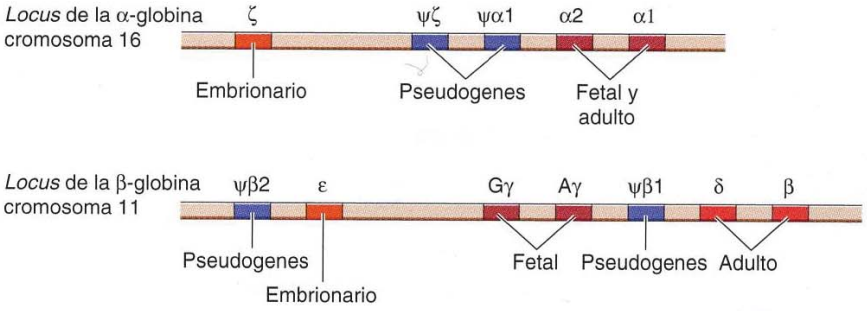


FIGURA 6.13 Familias del gen de la globina. Los miembros de las familias de los genes humanos de la α y β-globina se agrupan en los cromosomas 16 y 11, respectivamente. Cada familia contiene genes que se expresan específicamente en los tejidos embrionario, fetal y adulto, además de las copias de genes no funcionales (pseudogenes).

nético funcional. Por ejemplo, las familias de genes humanos de la α y β-globina contienen dos genes que han sido desactivados por mutaciones. Tales copias genéticas no funcionales (llamados **pseudogenes**) representan reliquias evolutivas que aumentan considerablemente el tamaño de los genomas eucariotas sin hacer ninguna contribución genética funcional. Estudios recientes han identificado alrededor de 11.000 pseudogenes en el genoma humano.

Las duplicaciones génicas pueden surgir por dos mecanismos diferentes. La primera es la duplicación de un segmento de ADN, que puede resultar en la transferencia de un bloque de ADN a una nueva localización en el genoma. Se estima que dichas duplicaciones de segmentos de ADN de entre 1 kb y más de 50 kb, forman aproximadamente el 5% del genoma humano. También pueden producirse duplicaciones de todo el genoma, que son comunes sobre todo en las plantas. Por ejemplo, la secuencia del genoma de *Arabidopsis* indica que ha experimentado al menos dos duplicaciones del genoma completo, seguidas por la pérdida gradual de algunos de los genes duplicados. El gran número de genes codificantes de proteínas en *Arabidopsis* (26.000) es consecuencia de estas duplicaciones, como sucede también con el gran tamaño y el elevado número de genes de los genomas de otras plantas.

Por otro lado, los genes pueden duplicarse mediante transcripción inversa de un ARNm, seguido de integración de la copia de ADNc en un nuevo punto cromosómico (**retrotransposición**) (**Fig. 6.14**). Este modo de duplica-

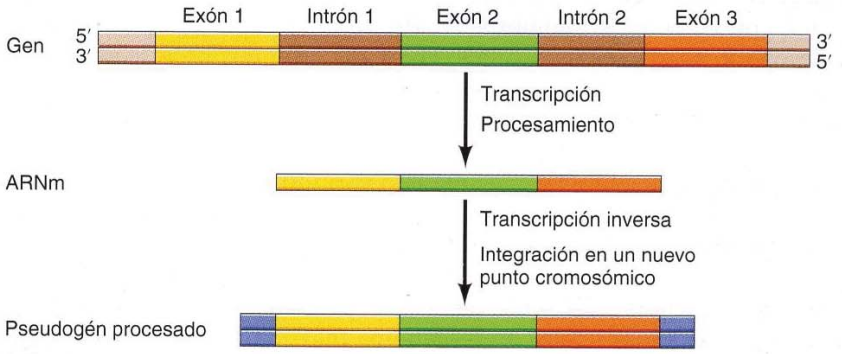


FIGURA 6.14 Formación de un pseudogén procesado. Un gen es transcrito y procesado para dar lugar a un ARNm del cual se han eliminado los intrones. El ARNm es copiado mediante transcripción inversa, dando lugar a una copia de ADNc que carece de intrones. La integración en el ADN cromosómico resulta en la formación de un pseudogén procesado.

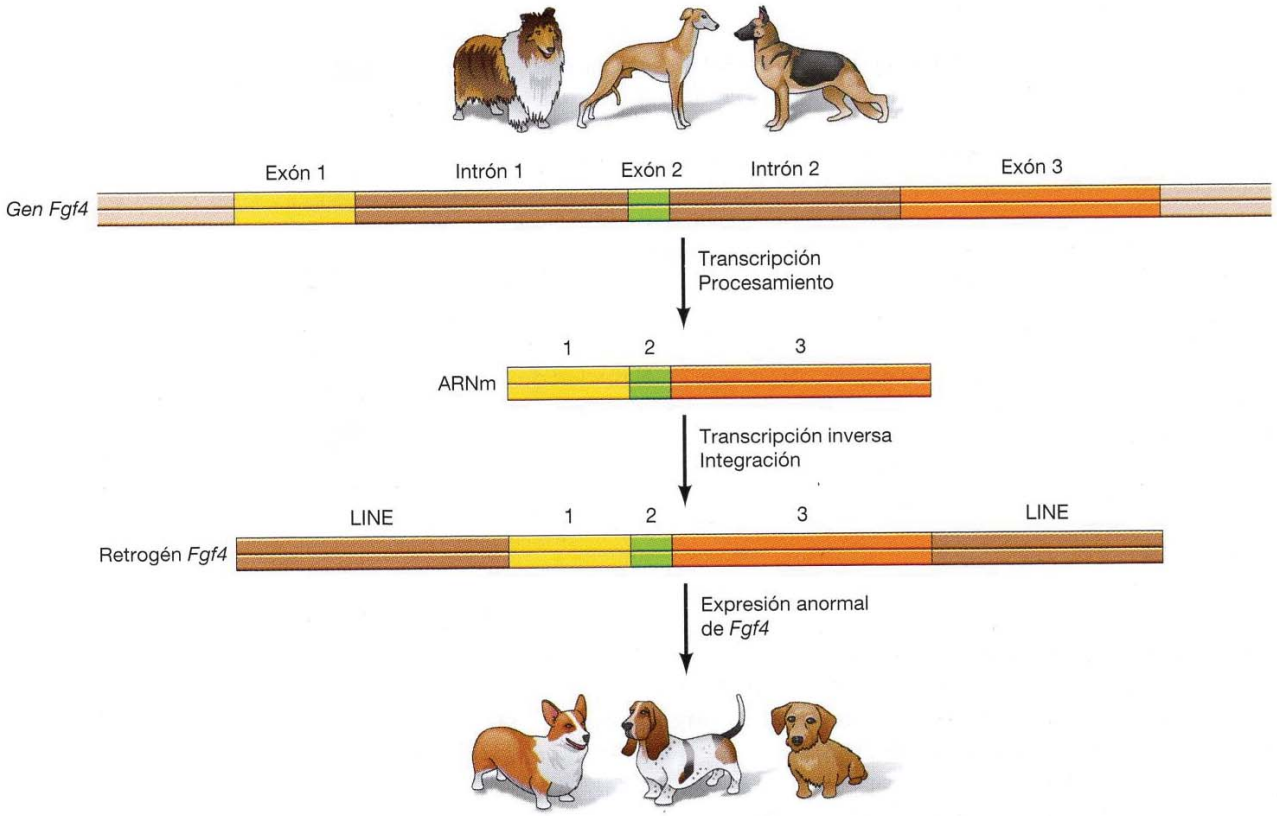


FIGURA 6.15 La transposición de un retrogén determina las patas cortas en algunas razas de perros. El gen *Fgf4* en las razas caninas con patas largas se expresa desde su localización cromosómica normal. En el caso de perros de patas cortas, el gen ha sufrido una retrotransposición y se ha integrado en medio de un LINE. Este retrogen transpuesto se expresa anormalmente, dando como resultado la finalización prematura del crecimiento óseo y las patas cortas características de algunas razas.

ción génica, análogo a la transposición de elementos repetitivos a través de intermediarios de ARN, resulta en la formación de copias genéticas que carecen de intrones y que carecen también de las secuencias cromosómicas normales que dirigen la transcripción de un gen en ARNm. Como resultado, la duplicación de un gen por transcripción inversa generalmente da lugar a una copia génica inactiva denominada **pseudogén procesado**. Se estima que existen varios miles de pseudogenes procesados en el genoma humano.

A diferencia de los seudogenes procesados, algunos genes duplicados por transcripción inversa siguen siendo funcionales una vez insertados en una nueva localización cromosómica. Un ejemplo curioso es el gen responsable de las piernas cortas características de algunas razas de perros, como los perros salchicha y los sabuesos (**Fig. 6.15**). Este es el resultado de la retrotransposición de un gen que inhibe el crecimiento óseo. El retrogén transpuesto es activo pero se expresa anormalmente en su nueva localización, probablemente debido a la regulación de un LINE adyacente, que ilustra también el papel de los LINE en la regulación de la expresión de genes adyacentes. Debido a la expresión anómala del gen transpuesto, el crecimiento óseo se detiene prematuramente y los perros tienen las patas cortas.

Cromosomas y cromatina

No sólo los genomas de la mayoría de los eucariotas son más complejos que los de los procariotas, sino que el ADN de las células eucariotas se encuentra organizado de forma diferente al de las células procariotas. Los genomas de los procariotas los contienen cromosomas únicos, que normalmente son moléculas de ADN circulares. Por el contrario, los genomas de los eucariotas están compuestos por múltiples cromosomas, cada uno de los cuales contiene una molécula de ADN lineal. Aunque el tamaño y el número de los cromosomas varía considerablemente entre las especies (**Tabla 6.4**), su estructura básica es la misma en todos los eucariotas. El ADN de las células eucariotas está fuertemente unido a unas pequeñas proteínas básicas (histonas) que empaquetan el ADN de manera ordenada en el núcleo de la célula. Esta característica resulta primordial, y se da en el ADN de la mayoría de los eucariotas. Por ejemplo, la longitud total extendida del ADN en una célula humana es de unos 2 m, pero este ADN debe caber en un núcleo con un diámetro de tan solo 5 μm a 10 μm.

ANIMACIÓN 6.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a6.1

Cromatina y cromosomas. En una célula eucariota, el ADN está altamente enrollado en torno a las proteínas histonas (formando cromatina), y cuando una célula se prepara para la división, la cromatina se enrolla sobre sí misma múltiples veces para formar cromosomas compactos.

Cromatina

Los complejos entre el ADN eucariótico y las proteínas forman la **cromatina**, que contiene alrededor del doble de proteína que de ADN. Las proteínas principales en la cromatina son las **histonas** —pequeñas proteínas que contienen una gran proporción de aminoácidos básicos (arginina y lisina) que facilitan la unión con la molécula de ADN cargada negativamente—. Existen cinco tipos importantes de histonas —llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4— que resultan muy similares entre las diferentes especies eucariotas (**Tabla 6.5**). Las histonas son tremendamente abundantes en las células eucariotas; su masa total resulta aproximadamente igual al ADN de la célula. Además, la cromatina contiene aproximadamente una masa igual de una variedad de proteínas cromosómicas diferentes a las histonas, y están impli-

TABLA 6.4 Número de cromosomas en las células eucariotas

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)[a]	Número[a] de cromosomas
Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)	12	16
Moho del lodo (*Dictyostelium*)	70	7
Arabidopsis thaliana	125	5
Maíz	2.200	10
Cebolla	15.000	8
Lirio	50.000	12
Nematodo (*Caenorhabditis elegans*)	97	6
Mosca de la fruta (*Drosophila*)	180	4
Sapo (*Xenopus laevis*)	3.000	18
Pez pulmón	50.000	17
Pollo	1.200	39
Ratón	3.000	20
Vaca	3.000	30
Perro	3.000	39
Humano	3.000	23

[a] Tanto el tamaño del genoma como el número de cromosomas son para células haploides.
Mb = millones de pares de bases.

VÍDEO 6.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v6.1

Cómo se empaqueta el ADN. El ADN está densamente arrollado en torno a proteínas para formar cromatina, que después se enrolla y se empaqueta, constituyendo el cromosoma.

TABLA 6.5 Principales proteínas de las histonas

Histona[a]	Peso molecular	Número de aminoácidos	Porcentaje de lisina + arginina
H1	22.500	244	30,8
H2A	13.960	129	20,2
H2B	13.774	125	22,4
H3	15.273	135	22,9
H4	11.236	102	24,5

cadas múltiples actividades, incluyendo la replicación del ADN y la expresión génica.

La unidad básica estructural de la cromatina, el **nucleosoma**, fue descrito por Roger Kornberg en 1974 (**Fig. 6.16**). Kornberg propuso el modelo de nucleosoma de acuerdo con dos tipos de experimentos. Primero, la digestión

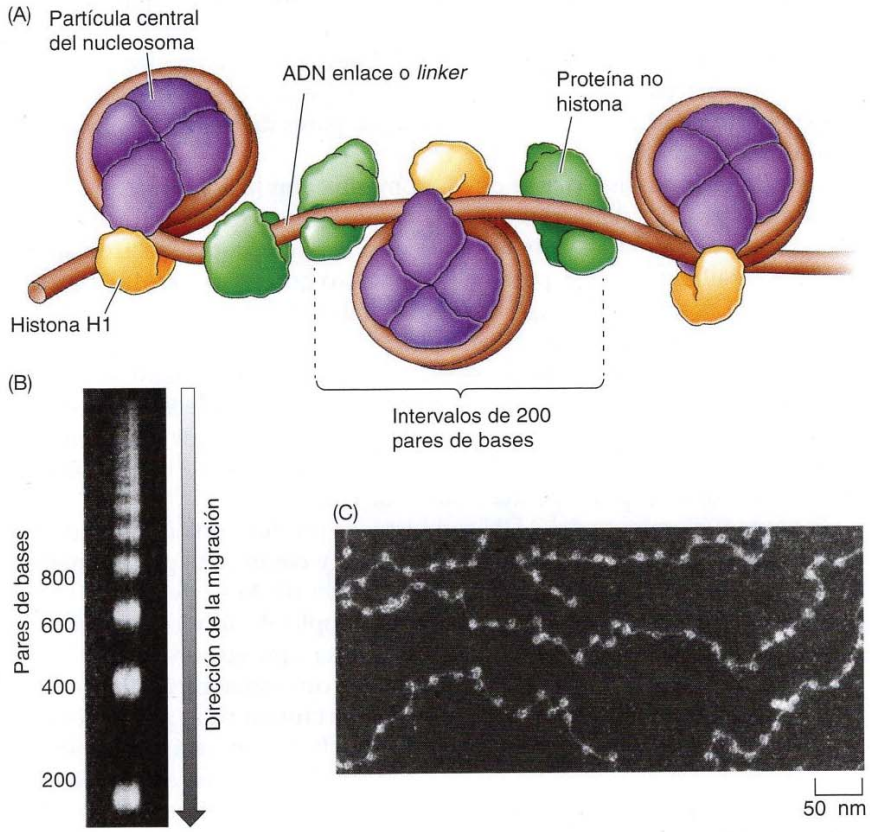


FIGURA 6.16 Organización de la cromatina en nucleosomas. (A) El ADN se envuelve alrededor de las histonas en las partículas centrales o core del nucleosoma y es sujetado por la histona H1. Las proteínas no histonas se unen al ADN de enlace o *linker* entre los nucleosomas y las partículas centrales. (B) Gel de electroforesis de fragmentos de ADN obtenidos de la digestión parcial de la cromatina con la nucleasa micrococal. El ADN de enlace entre las partículas centrales o *core* del nucleosoma es especialmente sensible, por lo que la digestión limitada de la cromatina produce fragmentos correspondientes a múltiplos de 200 pares de bases. (C) Una micrografía electrónica de una fibra de cromatina extendida, ilustrando su apariencia de collar de cuentas. (B, cortesía de Roger Kornberg, Stanford University; C; cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

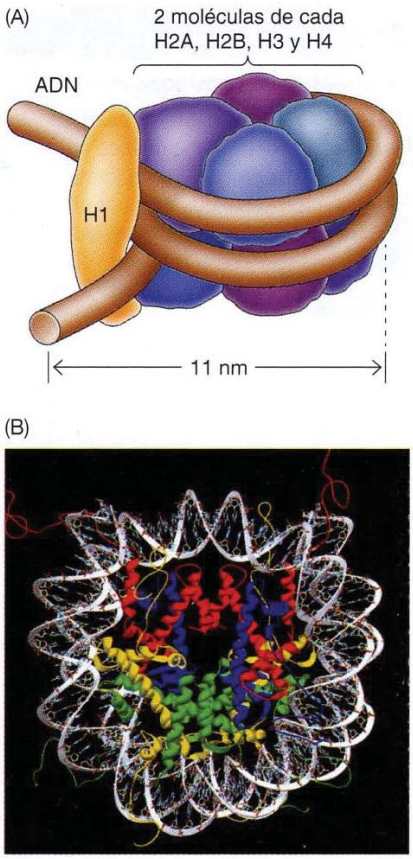


FIGURA 6.17 Estructura de un cromatosoma. (A) La partícula central o core del nucleosoma consta de 147 pares de bases de ADN envuelto 1,67 vueltas alrededor de un centro de histonas que consta de dos moléculas de cada H2A, H2B, H3 y H4. Un cromatosoma contiene dos vueltas completas de ADN (166 pares de bases) sujetas por una molécula de H1. (B) Modelo de una partícula central o core del nucleosoma. Las cadenas de ADN se muestran en marrón y en turquesa. Las histonas se muestran en rojo (H3), azul (H4), amarillo (H2A) y verde (H2B). (B, tomado de CA Davey y cols., 2002, *J. Mol Biol.* 319: 1097).

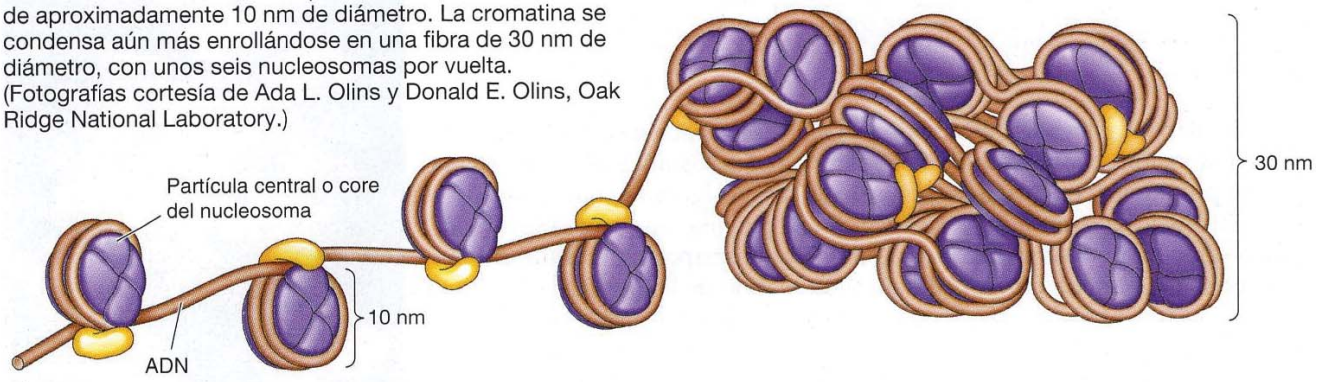
parcial de la cromatina con la nucleasa micrococal (una enzima que degrada el ADN) produjo fragmentos de ADN con una longitud de 200 pares de bases. Por el contrario, una digestión similar de ADN desnudo (no asociado a proteínas) produjo una mancha continua de fragmentos de diferentes tamaños. Estos resultados sugirieron que la unión de las proteínas al ADN en la cromatina protege algunas regiones del ADN de la digestión por la nucleasa, de manera que la enzima puede atacar al ADN solamente en lugares separados por aproximadamente 200 pares de bases. De acuerdo con esta idea, la microscopia electrónica reveló que las fibras de cromatina tienen una apariencia de collar de cuentas, con las cuentas separadas a intervalos de unas 200 pares de bases. Por tanto, la digestión por la nucleasa y los estudios por microscopia electrónica sugirieron que la cromatina está compuesta por unidades que se repiten cada 200 pares de bases, que fueron llamadas nucleosomas.

Una digestión más extensa de la cromatina con la nucleasa micrococal producía partículas (llamadas **partículas centrales o cores del nucleosoma**) que correspondían a las cuentas visibles por microscopia electrónica. Un análisis detallado de estas partículas demostró que contienen 147 pares de bases de ADN enrolladas 1,67 veces alrededor del centro de histonas formado por dos moléculas de H2A, H2B, H3 y H4 (las histonas del centro) (**Fig. 6.17**). Una molécula de la quinta histona, H1, se encuentra unida al ADN cuando entra en una partícula central o core del nucleosoma. Esto forma una subunidad de cromatina llamada **cromatosoma**, que está compuesto por 166 pares de bases de ADN envuelto alrededor del centro de histonas y sujeto en su lugar por H1 (una histona de enlace).

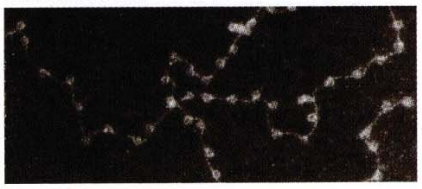
El empaquetamiento del ADN con histonas produce una fibra de cromatina aproximadamente de 10 nm de diámetro y compuesta por cromatosomas separados por segmentos de enlace o *linker* de ADN de unos 50 pares de bases de longitud (**Fig. 6.18**). En el microscopio electrónico, esta fibra de 10 nm presenta la apariencia de collar de cuentas que sugiere el modelo del nucleosoma. Empaquetar el ADN en una fibra de cromatina de 10 nm reduce su longitud aproximadamente seis veces. La cromatina se puede condensar aún más enrollándola para formar fibras de 30 nm, resultando en una condensación total de unas 50 veces. Las interacciones entre las moléculas de histona H1 parecen jugar un papel importante en esta fase de la condensación cromatínica, que es crítico para determinar la accesibilidad al ADN cromosómico para procesos como la replicación y transcripción del ADN. El plegamiento de las fibras de 30 nm sobre sí mismas hace posible una mayor condensación de la cromatina en el interior de la célula. A pesar de su importancia, aún no se conoce con detalle la estructura exacta de las fibras de 30 nm.

El grado de condensación cromatínica varía durante el ciclo celular y juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, como se analizará en el Capítulo 8. En células en interfase (sin dividirse), la mayoría de la cromatina (llamada **eucromatina**) se encuentra relativamente sin condensar y distribuida por todo el núcleo (**Fig. 6.19**). Durante este período del

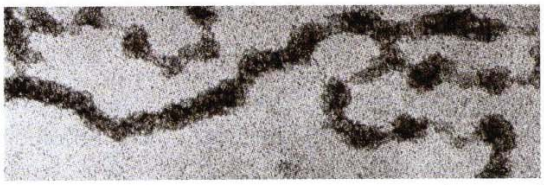
FIGURA 6.18 Fibras de cromatina. El empaquetamiento del ADN en los nucleosomas produce una fibra de cromatina de aproximadamente 10 nm de diámetro. La cromatina se condensa aún más enrollándose en una fibra de 30 nm de diámetro, con unos seis nucleosomas por vuelta. (Fotografías cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)



Fibra de 10 nm



Fibra de 30 nm



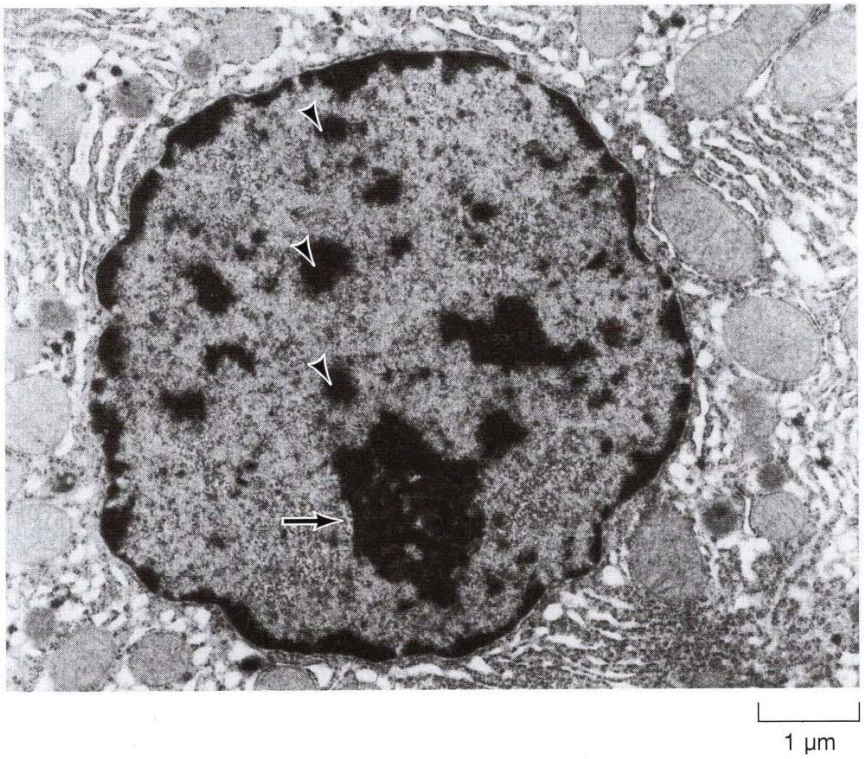


FIGURA 6.19 Cromatina en la interfase. Micrografía electrónica de un núcleo en interfase. La eucromatina se distribuye por el núcleo. La heterocromatina se indica con los triángulos y el nucléolo con una flecha. (Cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

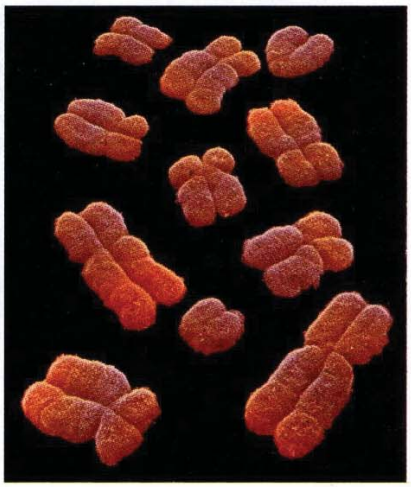


FIGURA 6.20 Condensación de la cromatina durante la mitosis. Micrografía electrónica de barrido de cromosomas de metafase. Añadido color artificial.

ciclo celular, los genes se transcriben y el ADN se replica como preparación para la división. La mayoría de la eucromatina en los núcleos en interfase parece presentarse en forma de fibras de 30 nm, o algo más condensado de 60 a 130 nm. Los genes que son transcritos activamente, se encuentran en un estado menos condensado, lo que permite la transcripción. Al contrario de la eucromatina, alrededor del 10% de la cromatina de la interfase (llamada **heterocromatina**) se encuentra en un estado condensado que recuerda a la cromatina de las células que llevan a cabo la mitosis. La heterocromatina es transcripcionalmente inactiva y contiene secuencias de ADN altamente repetitivas, como aquellas presentes en los centrómeros y telómeros (como se describe en la siguiente sección) así como genes que no se expresan en el tipo particular de célula examinado (por ejemplo, cromosomas X inactivos; véase Fig. 6.9).

Cuando la célula entra en mitosis, sus cromosomas se condensan para poder ser distribuidos a las células hijas. La cromatina de los núcleos en interfase está organizada en lazos que creemos que se repliegan sobre sí mismos hasta formar los compactos cromosomas de metafase de las células en mitosis, en las que el ADN está casi diez mil veces más condensado (**Fig. 6.20**). Esta cromatina condensada no puede ser utilizada como molde para la síntesis de ARN, así que la transcripción cesa durante la mitosis. Las micrografías electrónicas indican que el ADN en los cromosomas de la metafase está organizado en grandes lazos unidos a un andamio o escalón de proteínas (**Fig. 6.21**), aunque todavía no se ha llegado a entender con detalle la estructura de la cromatina condensada ni el mecanismo de condensación de ésta.

Los cromosomas de la metafase se encuentran en un estado de concentración muy alto, tanto que su morfología puede ser estudiada a través del microscopio óptico (**Fig. 6.22**). Las diferentes técnicas de tinción proporcionan patrones característicos de bandas cromosómicas luminosas y oscuras, como resultado de la unión preferente de los tintes fluorescentes o de manchas a las secuencias de ADN ricas en AT en lugar de las secuencias ricas en GC. Estas son específicas para cada cromosoma y parecen representar diferentes regiones de los cromosomas. Los genes pueden ser localizados en bandas cromosómicas específicas mediante hibridación *in situ*, indicando que el empaquetamiento del ADN en los cromosomas de la metafase es un proceso con un riguroso orden y de carácter reproducible.

Centrómeros

El **centrómero** es una región especializada del cromosoma cuyo papel es asegurar la correcta distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas durante la mitosis (**Fig. 6.23**). El ADN celular se duplica durante la interfase, resultando la formación de dos copias de cada cromosoma antes de que comience la mitosis. Cuando la célula entra en mitosis, la condensación de la cromatina conduce a la formación de los cromosomas de la metafase, que consisten en dos cromátidas hermanas idénticas. Estas cromátidas

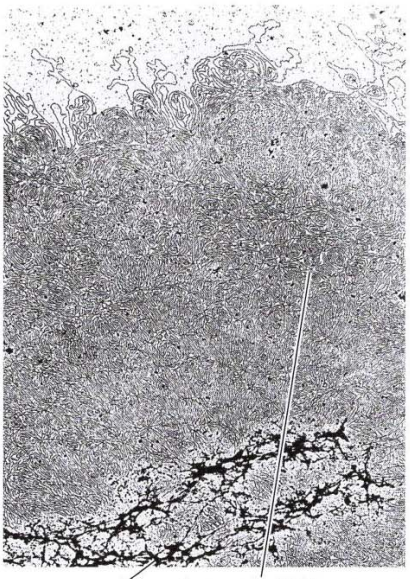


FIGURA 6.21 Estructura de los cromosomas de la metafase. Una micrografía electrónica de lazos de ADN unidos al andamio de proteína de los cromosomas en metafase que han sido liberados de las histonas. (De J. R. Paulson y U. K. Laemmli, 1977. *Cell* 12: 817.)

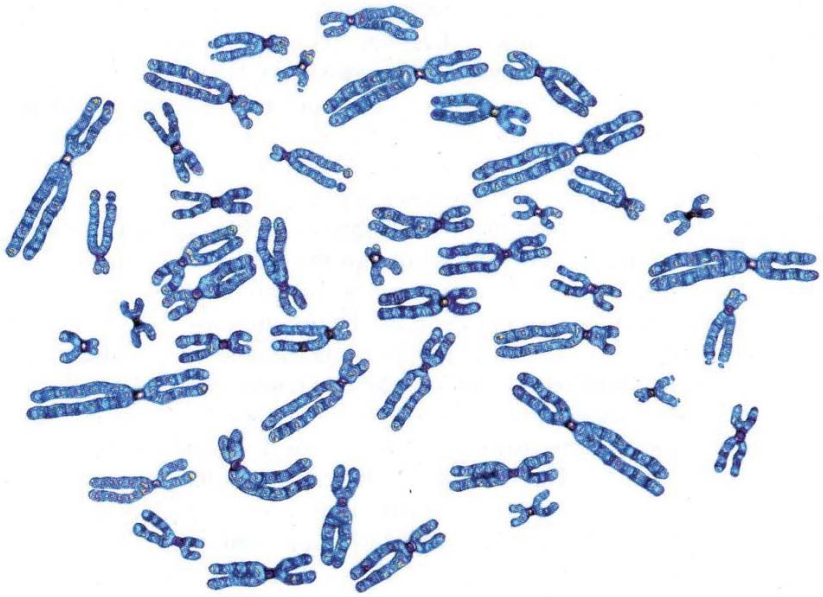


FIGURA 6.22 Cromosomas humanos en metafase. Una micrografía de cromosomas humanos extendidos a partir de una célula en metafase.

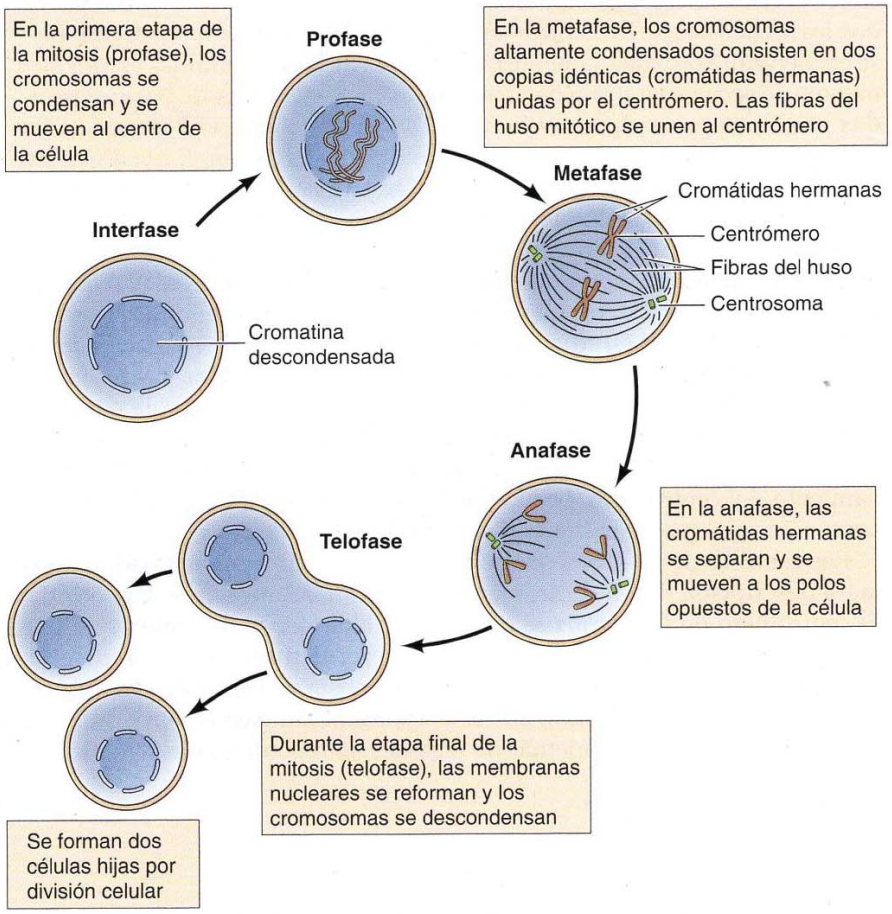


FIGURA 6.23 Cromosomas durante la mitosis. Puesto que el ADN se replica durante la interfase, la célula contiene dos copias duplicadas idénticas de cada cromosoma antes de entrar en mitosis.

hermanas se mantienen unidas por el centrómero, el cual se considera como una región cromosómica compacta. Una vez iniciada la mitosis, los microtúbulos del huso mitótico se adhieren al centrómero, y las dos cromátidas hermanas se separan y se dirigen a los polos opuestos del huso. Al final de la mitosis, las membranas nucleares se restablecen y los cromosomas se descondensan, resultando la formación de los núcleos de las células hermanas que contienen una copia de cada cromosoma parental.

Por tanto, los centrómeros actúan como sitios de asociación de las cromátidas hermanas y como sitios de unión para los microtúbulos del huso mitótico. Las proteínas asociadas a los centrómeros forman una estructura especializada denominada **cinetocoro** (**Fig. 6.24**). La unión de los microtúbulos a las proteínas del cinetocoro dirige la unión de los cromosomas al huso mitótico. Las proteínas asociadas al cinetocoro actúan como «motores moleculares» que conducen el movimiento de los cromosomas a lo largo de las fibras del huso, segregando los cromosomas a los núcleos de las células hijas.

Las mejores secuencias de ADN centroméricas han sido descritas en levaduras, donde su función puede probarse siguiendo la segregación de los plásmidos en mitosis (**Fig. 6.25**). Los plásmidos que contienen centrómeros funcionales se segregan como los cromosomas y se distribuyen de igual forma a las células hijas una vez terminada la mitosis. En ausencia de un centrómero funcional, sin embargo, el plásmido no se segrega adecuadamente, y muchas células hijas no heredan el ADN del plásmido. Los ensayos de este tipo han permitido determinar las secuencias necesarias para la función del centrómero. Este tipo de experimentos mostraron por primera vez que las secuencias de los centrómeros de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran aproximadamente en 125 pares de bases divididas en tres elementos de secuencia: dos secuencias cortas de 8 a 25 pares de bases separadas por 78-86 pares de bases de un ADN muy rico en A/T (**Fig. 6.26A**).

Las secuencias cortas de los centrómeros definidas en *S. cerevisiae*, no obstante, no parecen reflejar la situación en otros eucariotas, como la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Aunque *S. cerevisiae* y *S. pombe* son levaduras, parecen ser muy divergentes la una de la otra y muy diferentes en muchos aspectos de su biología celular. Estas dos especies de levaduras proporcionan modelos complementarios para el estudio de células eucariotas simples y de fácil estudio. Los centrómeros de *S. pombe* se extienden de 40 a 100 kb de ADN; son aproximadamente mil veces más largos que los de *S. cerevisiae*. Se componen de un centro de 4 a 7 kb de una sola copia de ADN flanqueada por secuencias repetitivas (**Fig. 6.26B**). Tanto el centro como las secuencias repetitivas flanqueantes son necesarios para el funcionamiento del centrómero, por lo que los centrómeros de *S. pombe* parecen ser considerablemente más complejos que los de *S. cerevisiae*.

Los estudios de un cromosoma de *Drosophila* han proporcionado la primera descripción de un centrómero en eucariotas superiores (**Fig. 6.26C**). El centrómero de *Drosophila* se extiende 420 kb, del cual la mayoría (más del 85%) consta de dos ADN satélites muy repetitivos con las secuencias AATAT y AAGAG. El resto del centrómero consta de elementos transponibles dispersos (transposones), que se encuentran también en otros sitios en el genoma de *Drosophila*, además de regiones no repetitivas de ADN rica en A/T.

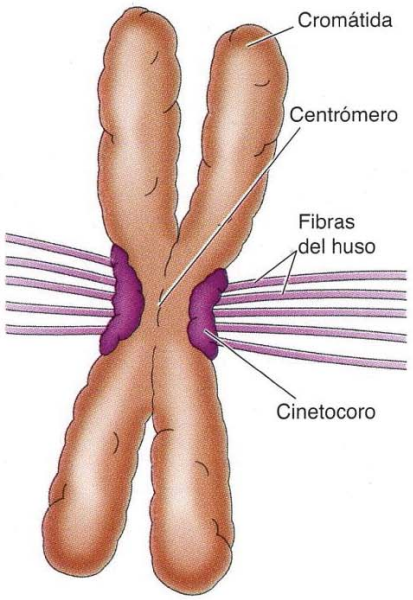


FIGURA 6.24 Centrómero en cromosomas de metafase. El centrómero es la región por donde las dos cromátidas hermanas siguen unidas en la metafase. Proteínas específicas se unen al ADN centromérico, formando el cinetocoro, que es el lugar de anclaje de las fibras del huso.

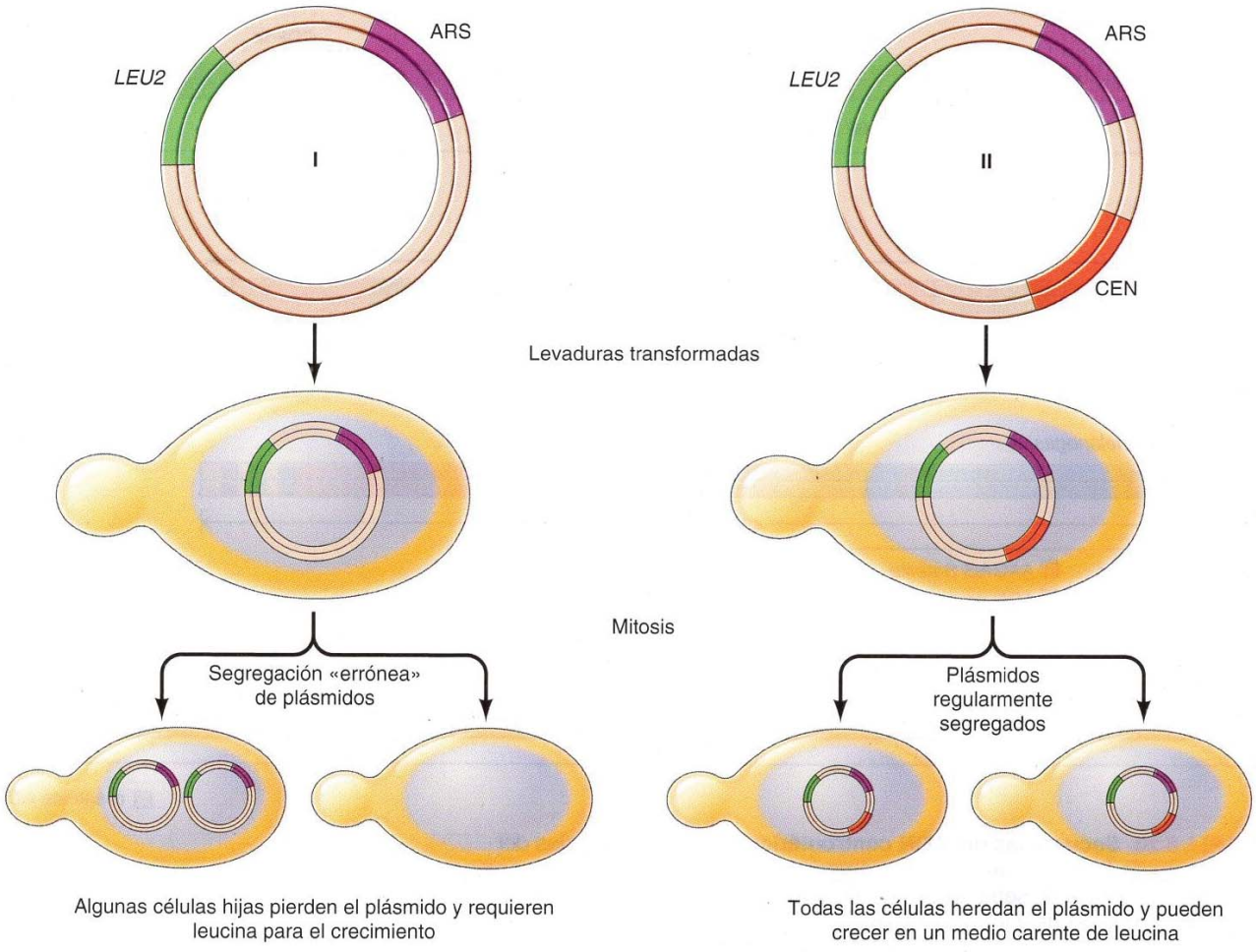


FIGURA 6.25 Ensayo de un centrómero en levaduras. Ambos plásmidos contienen un marcador (*LEU2*) y secuencias de ADN que sirven como orígenes de replicación en levaduras (ARS, que significa secuencia de replicación autónoma). Sin embargo, el plásmido I carece de un centrómero y, por tanto, se pierde con frecuencia como resultado de una segregación errónea durante la mitosis. Por el contrario, la presencia de un centrómero (CEN) en el plásmido II asegura su transmisión regular a las células hijas.

Los centrómeros de otras plantas y animales están caracterizados porque la heterocromatina contiene zonas extensas de secuencias altamente repetitivas. En *Arabidopsis*, los centrómeros consisten en 3 millones de pares de bases de un ADN satélite de 178 pares de bases rico en A/T, que es una secuencia de 171 pares de bases rica en A/T dispuesta en repeticiones en tándem que abarcan de 1-5 millones de pares de bases (**Fig. 6.26D**).

No se ha logrado identificar secuencias específicas de ADN vinculadas con la función centromérica en los eucariotas con excepción de *S. cerevisiae* a pesar de los esfuerzos realizados a este fin. Por otra parte, se ha demostrado que la cromatina centromérica posee una estructura única. Concretamente, esta cromatina contiene una variante similar a la histona H3 denominada H3 centromérica **(CenH3)** o **CENP-A** en lugar de la histona H3 (está presente de manera uniforme en los centrómeros de todos los organismos estudiados hasta ahora y el ensamblaje de las demás proteínas del cinetócoro necesarias para el funcionamiento del centrómero depende de la participación de nucleosomas que contengan CenH3. Por consiguiente, parece que el

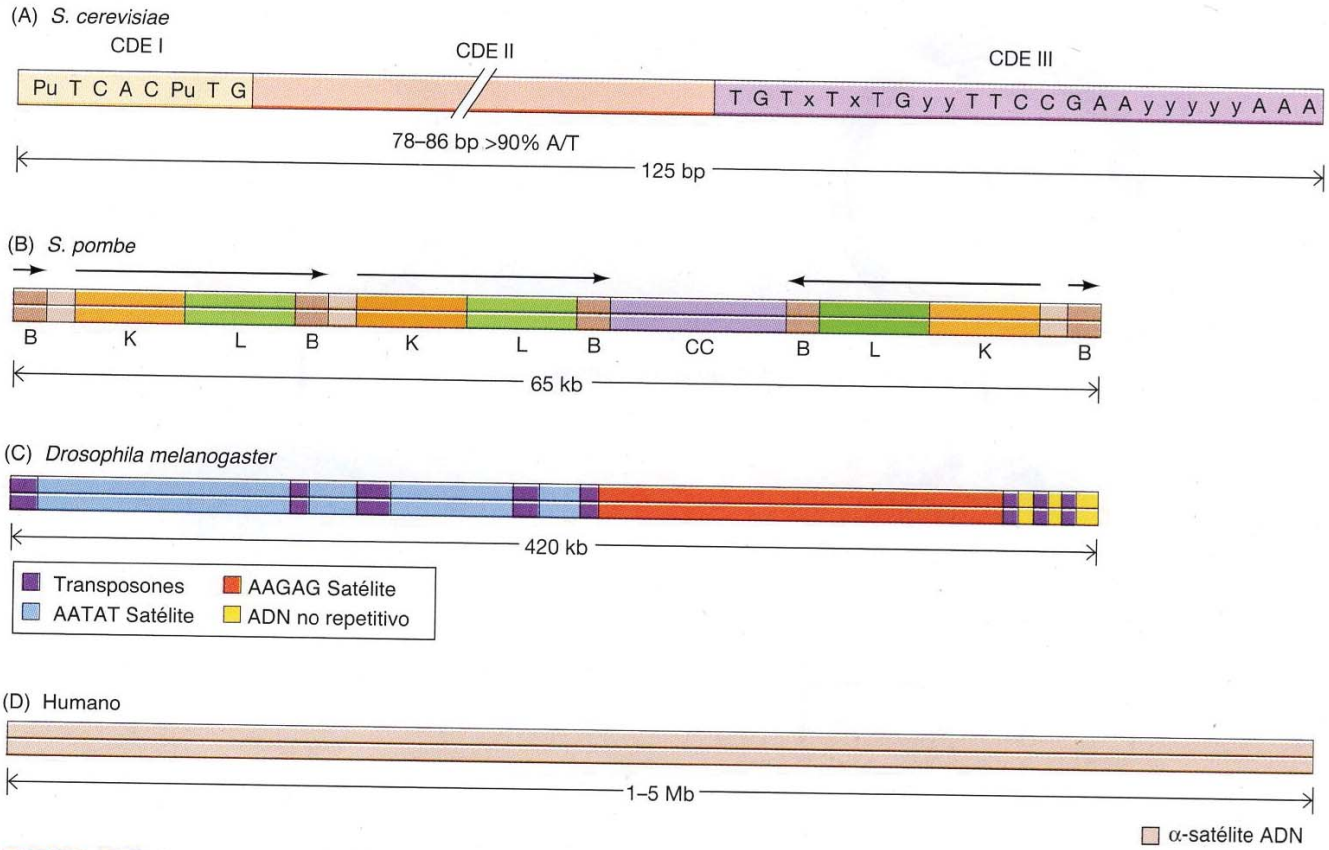


FIGURA 6.26 Secuencias del ADN centromérico. (A) Las secuencias del centrómero de *S. cerevisiae* (CEN) se componen de dos secuencias conservadas cortas (CDE I y CDE III) separadas por 78 a 86 pares de bases (pb) de ADN rico en A/T (CDE II). Las secuencias mostradas son secuencias consenso derivadas del análisis de las secuencias de los centrómeros de cromosomas individuales de levaduras. Pu = A o G; x = A o T; y = cualquier base. (B) Se ilustra la organización de las secuencias del centrómero del cromosoma II de *S. pombe*. El centrómero consiste en un grupo central (CC) de secuencia única de ADN, rodeado por repeticiones en tándem de tres elementos de secuencia repetitivos (B, K, y L). (C). El centrómero de *Drosophila* consiste en dos secuencias satélite, elementos transponibles y ADN no repetitivo que comprende varios cientos de kilobases (kb). (D) Centrómeros del ser humano formados por repeticiones tándem de ADN α-satélite rico en A/T de 171 pares de bases que comprende entre 1 y 5 millones de pares de bases (Mb).

principal determinante de la identidad y la función de los centrómeros sería la estructura de la cromatina en lugar de una secuencia específica de ADN).

Cabe destacar que la estructura única de la cromatina estabiliza a los centrómeros durante la división celular incluso en ausencia de secuencias específicas de ADN centromérico, lo que representa un ejemplo de **herencia epigenética** —la transferencia de información *no* basada en la secuencia del ADN de una célula parental a su descendencia—. La información se transmite a través de las histonas tanto en este como en muchos otros tipos de herencia epigenética (Cap. 8) (**Fig. 6.27**). Cuando se replica el ADN cromosómico, los nucleosomas de la hebra parental se distribuyen a las dos hebras hijas, de modo que los nucleosomas de los centrómeros de los dos nuevos cromosomas contienen CENP-A. Estos nucleosomas que contienen CENP-A dirigen la incorporación de nuevos nucleosomas con CENP-A a la cromatina, gracias a lo cual se mantiene la estructura de la cromatina tras la división celular.

◆ Las células cancerosas tienen niveles elevados de telomerasa, lo que les permite mantener los extremos de sus cromosomas a través de un número indefinido de divisiones. Puesto que las células somáticas normales carecen de actividad telomerasa y no se dividen indefinidamente, los principios activos que inhiben la telomerasa se están desarrollando como agentes anticáncer (Cap. 19).

Telómeros

Las secuencias situadas al final de los cromosomas de eucariotas, llamados **telómeros**, desempeñan un papel crítico en la replicación y el mantenimiento del cromosoma. Los telómeros inicialmente se reconocieron como estructuras distintas ya que los cromosomas rotos eran altamente inestables en las células eucariotas, implicando la necesidad de secuencias específicas en las terminaciones cromosómicas normales. Esto se demostró mediante experimentos en los que los telómeros del protozoo *Tetrahymena* fueron añadidos a los extremos de moléculas lineales de ADN plasmídico de levaduras. La suma de estas secuencias de ADN telomérico permitió a estos plásmidos replicarse como cromosomas lineales igual que las moléculas en las levaduras, demostrando directamente que los telómeros son necesarios para la replicación de las moléculas lineales de ADN.

Las secuencias de ADN de los telómeros de los eucariotas son similares, presentando repeticiones de una secuencia simple de ADN que contiene grupos de residuos de G en una hebra (**Tabla 6.6**). Por ejemplo, la secuencia de las repeticiones de los telómeros en humanos y en otros mamíferos es TTAGGG, y la repetición telomérica en *Tetrahymena* es TTGGGG. Estas secuencias se repiten cientos o miles de veces, y terminan con una prolongación en el extremo 3′ de una sola hebra de ADN. Las secuencias repetidas del ADN telomérico de algunos organismos (incluyendo el ser humano) forman bucles al final de los cromosomas y se une a un complejo proteico (shelterina) que protege a los extremos del cromosoma frente a su degradación (**Fig. 6.28**).

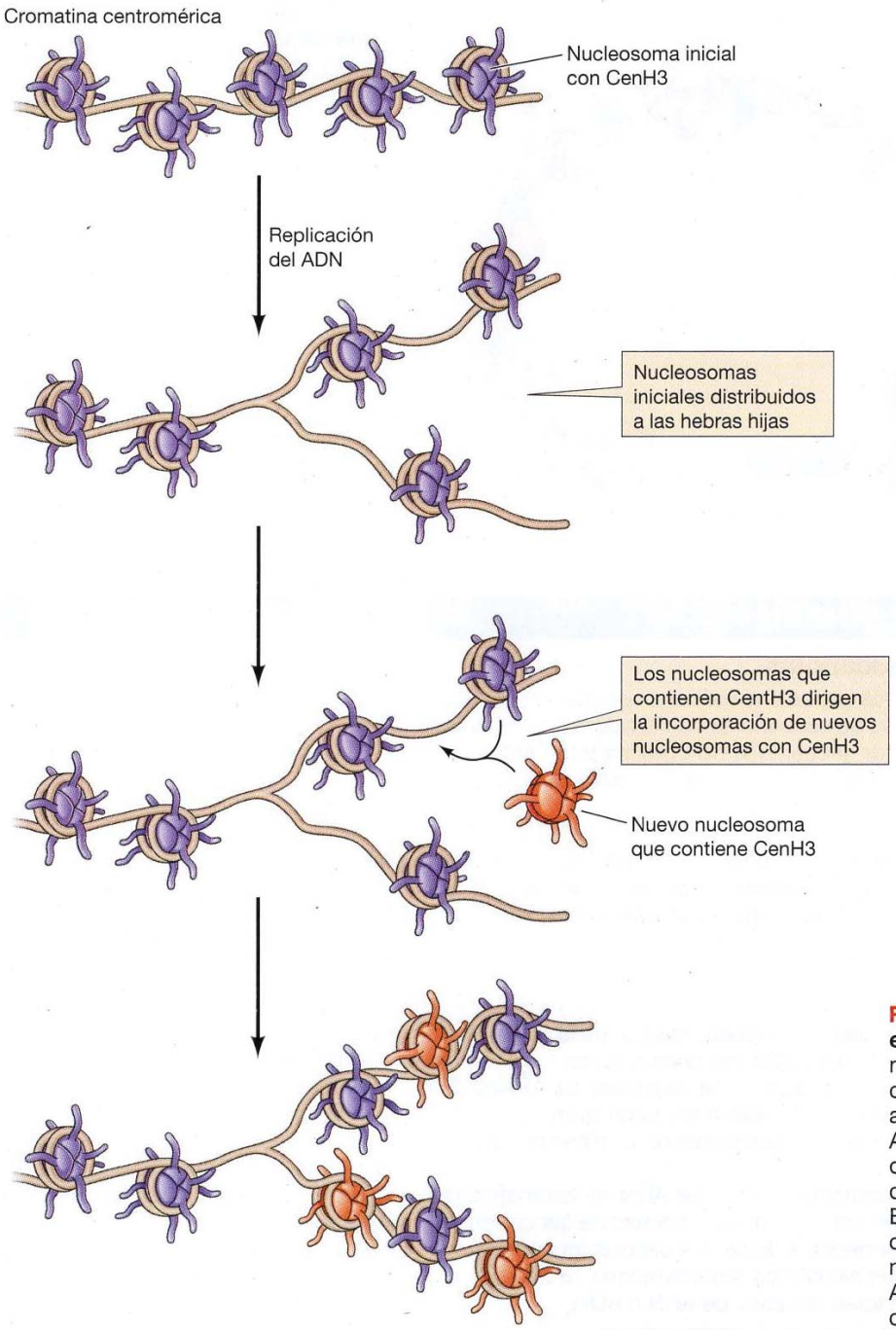


FIGURA 6.27 Herencia epigenética de CEPN-A. Los nucleosomas de los centrómeros contienen la histona variante similar a H3 CENP-A. Cuando se replica el ADN, los nucleosomas parentales que contienen CENP-A se distribuyen a ambas cadenas hijas. Estos nucleosomas con CENP-A dirigen la incorporación de nuevos nucleosomas que contienen CENP-A, manteniendo la estructura de los centrómeros en la cromatina.

Los telómeros desempeñan un papel importante en la replicación de los extremos de las moléculas de ADN lineal (véase Cap. 7). La ADN polimerasa es capaz de extender una cadena de ADN en crecimiento pero no puede iniciar la síntesis de una nueva cadena al final de una molécula lineal de ADN. Como consecuencia, las terminaciones de los cromosomas lineales no pueden ser replicadas por la ADN polimerasa en condiciones normales. Este problema se ha resuelto por la evolución de una enzima especial, la **telomerasa**, que emplea actividad transcriptasa inversa para replicar las secuencias de ADN telomérico. El mantenimiento de los telómeros parece ser un factor importante a la hora de determinar las expectativas de vida y la capacidad reproductiva de las células, por lo que los estudios de los telómeros y de la telomerasa son prometedores al respecto de nuevos datos sobre cuestiones como la edad y el cáncer.

TABLA 6.6 ADN teloméricos

Organismo	Secuencia telomérica repetida
Levaduras	
Saccharomyces cerevisiae	TG_{1-3}
Schizosaccharomyces pombe	$TTACG_{2-5}$
Protozoo	
Tetrahymena	TTGGGG
Dictyostelium	AG_{1-8}
Planta	
Arabidopsis	TTTAGGG
Mamífero	
Humano	TTAGGG

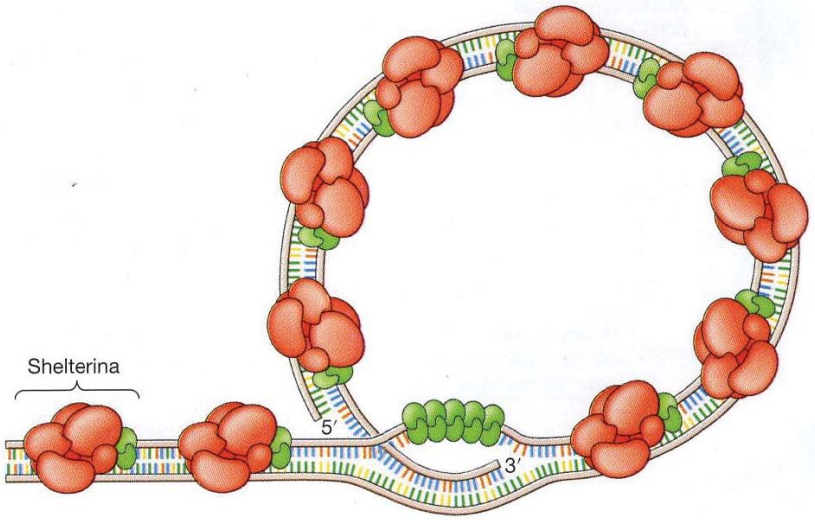


FIGURA 6.28 Estructura de un telómero. El ADN telomérico forma un bucle sobre sí mismo para formar una estructura circular con un complejo proteico (shelterina) que protegen los extremos de los cromosomas.

RESUMEN

La estructura de los genes eucariotas

Intrones y exones: La mayoría de los genes eucariotas presentan una estructura dividida en la que los segmentos de secuencias codificadoras o codificantes (exones) están interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). En los eucariotas complejos, los intrones representan unas diez veces más ADN que los exones.

Funciones de los intrones: Aunque se extraen de los ARNm, los intrones tienen múltiples funciones celulares. Algunos genes se codifican en los intrones de genes más grandes. Además, los intrones contienen secuencias reguladoras y permiten un *splicing* alternativo.

Secuencias no codificantes

ARN no codificantes: Diversos ARN tienen funciones distintas de la codificación de proteínas. Algunos ARN no codificantes actúan en síntesis de proteínas (ARNt y ARNr), *splicing* de ARNm y procesamiento de ARNr. Además, los ARNmi son importantes reguladores de proteínas y se ha identificado un gran número de ARNlnc, muchos de los cuales actúan como reguladores de la expresión génica.

Secuencias repetitivas: Aproximadamente el 50% del ADN de los mamíferos consiste en secuencias de ADN altamente repetitivas, algunas de las cuales están presentes en 10^5 y 10^6 copias por genoma. Estas secuencias incluyen las repeticiones de secuencia sencilla y los elementos repetitivos que se han desplazado a través del genoma mediante intermediarios de ARN o ADN.

PALABRAS CLAVE

gen, exón, intrón, *splicing* de ARN, kilobase (kb), región 5' no traducida (UTR), región 3' no traducida (UTR)

gen anidado, *splicing* alternativo

interferencia de ARN (iARN), microARN (ARNmi), ARN no codificante largo (ARNlnc), inactivación del cromosoma X

repetición de secuencia sencilla, ADN satélite, SINE, LINE, elemento transmisible, retro-transposon, transposón de ADN, elemento tipo retrovirus

RESUMEN

Duplicación génica y pseudogenes: Muchos genes eucarióticos están presentes en múltiples copias, denominadas familias génicas, que han surgido por duplicación de genes ancestrales. Algunos miembros de las familias génicas funcionan en tejidos diferentes o durante distintas fases del desarrollo. Otros miembros de las familias génicas (pseudogenes) han sido inactivados por mutaciones y ya no representan genes funcionales. Las duplicaciones génicas pueden ocurrir por duplicación de un ADN, lo que comprende desde un segmento de ADN a todo el genoma. Aproximadamente el 5% del genoma humano consiste en segmentos de ADN duplicados, mientras que las duplicaciones de todo el genoma son comunes en las plantas. Alternativamente, la duplicación génica puede ocurrir por transcripción inversa de un ARNm, para dar lugar a un pseudogén procesado.

familia génica, pseudogén, retrotransposición, pseudogén procesado

Cromosomas y cromatina

Cromatina: El ADN de las células eucariotas se encuentra envuelto por histonas que forman nucleosomas. La cromatina se puede compactar aún más mediante el plegamiento de los nucleosomas en estructuras altamente ordenadas, incluyendo la condensación de los cromosomas en metafase de las células entrando en mitosis.

cromatina, histona, nucleosoma, partícula central del nucleosoma, cromatosoma, eucromatina, heterocromatina

Ver Animación 6.1 y Vídeo 6.1

Centrómeros: Los centrómeros son regiones especializadas de los cromosomas eucariotas que sirven como sitios en los que las cromátidas hermanas se unen y los puntos de unión de las fibras del huso durante la mitosis. La función centromérica depende de una variante histónica semejante a H3 que se mantiene por un mecanismo epigenético durante la división celular.

centrómero, cinetocoro CENP-A, herencia epigenética

Telómeros: Los telómeros son secuencias especializadas necesarias para el mantenimiento de los extremos de los cromosomas eucariotas.

telómero, telomerasa

Preguntas

1. Muchos organismos poseen tamaños de genoma que son mucho mayores de lo que su complejidad parece requerir. Explica esta paradoja.
2. ¿Cómo se descubrieron los intrones durante los estudios de ARNm de adenovirus?
3. ¿Cómo incrementan las secuencias intrónicas del genoma humano la diversidad de proteínas expresadas a partir de limitado número de aproximadamente 21.000 genes?
4. ¿Cómo puede separarse el ADN repetitivo de secuencia sencilla del resto del ADN nuclear?
5. ¿Cómo regulan los ARN no codificantes la expresión génica?
6. ¿Cómo puede distinguirse un pseudogén procesado de un pseudogén formado por duplicación de ADN?
7. Los centrómeros de levadura (*S. cerevisiae*) forman un cinetócoro que se une a un solo microtúbulo, mientras que en la mayoría de células animales múltiples microtúbulos están unidos a cinetócoros. ¿Cómo refleja esta diferencia la estructura de los centrómeros de *S. cerevisiae*?
8. Cuando se introduce una secuencia centromérica en un plásmido circular y se inserta en levaduras, sus genes se reproducen y segregan con normalidad en cada división celular; pero cuando se corta en un punto con una endonucleasa de restricción para crear un cromosoma lineal, los genes plasmídicos se pierden rápidamente por parte de las levaduras. Explícalo. ¿Qué experimento adicional realizarías para confirmar tu explicación hipotética?
9. Aproximadamente ¿cuántas moléculas de histona H1 están unidas al ADN genómico de levaduras?
10. ¿Cuál es la longitud media de un intrón en un gen humano?
11. Has construido una biblioteca en un vector plasmídico que contiene ADNc completos. ¿Cuál es el tamaño medio esperado de un inserto?
12. ¿Por qué muchas especies de plantas tienen un número de genes mayor que el de los humanos?

Bibliografía

Estructura de genes eucarióticos

Ben-Dov, C., B. Hartmann, J. Lundgren and J. Valcarel. 2008. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 283: 1229–1233. [R]

Berget, S. M., C. Moore and P. A. Sharp. 1977. Spliced segments at the 5′ terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 74: 3171–3175. [P]

Chorev, M. and L. Carmel. 2012. The function of introns. *Front. Genet.* 3: 55. [R]

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker and R. J. Roberts. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5′ ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1–8. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945. [P]

Kumar, A. 2009. An overview of nested genes in eukaryotic genomes. *Eukaryotic Cell* 8: 1321–1329. [R]

Nilsen, T. W. and B. R. Graveley. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457–463. [R]

The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57–74. [P]

Tilghman, S. M., P. J. Curtis, D. C. Tiemeier, P. Leder and C. Weissmann. 1978. The intervening sequence of a mouse -globin gene is transcribed within the 15S -globin mRNA precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 75: 1309–1313. [P]

Secuencias no codificantes

Bartel, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233. [R]

Cordaux, R. and M. A. Batzer. 2009. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev. Genet.* 10: 691–703. [R]

Fatica, A. and I. Bozzoni. 2014. Long noncoding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev. Genet.* 15: 7–21. [R]

Guttman, M, J. and 16 others. 2011. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477: 295–300. [P]

Inui, M., M. Graziano and S. Piccolo. 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell . Biol.* 11: 252–263. [R]

Iyer, M. K. and 18 others. 2015. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genet.* 47: 199–208. [P]

Kazazian, H. H., Jr. 2004. Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626–1632. [R]

Kugel, J. F. and J. A. Goodrich. 2011. Noncoding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochem. Sci.* 37: 144–151. [R]

Lee, E. and 16 others. 2012. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science* 337: 967–971. [P]

Nagano, T. and P. Fraser. 2011. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell* 145: 178–181. [R]

Parker, H. G. and 16 others. 2009. An expressed *Fgf4* retrogene is associated with breed-defining chrondrodysplasia in domestic dogs. *Science* 325: 995–998. [P]

Pennisi, E. 2011. Green genomes. *Science* 332: 1373–1375. [R]

Shukla, R. and 22 others. 2013. Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell* 153: 101–111. [P]

Sutter, N. B. and 20 others. 2007. A single *IGF1* allele is a major determinant of small size in dogs. *Science* 316: 112–115. [P]

The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57–74. [P]

Ulitsky, I. and D. P. Bartel. 2013. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* 154: 26–46. [R]

Wang, K. C. and H. Y. Chang. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* 43: 904–914. [R]

Yang, L., J. E. Froberg and J. T. Lee. 2014. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem. Sci.* 39: 35-43. [R]

Zhang, Z. and M. Gerstein. 2004. Large-scale analysis of pseudogenes in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 328–335. [R]

Cromosomas y cromatines

Allshire, R. C. and G. H. Karpen. 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature Rev. Genet.* 9: 923–937. [R]

Black, B. E. and E. A. Bassett. 2008. The histone variant CENP-A and centromere specification. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 91–100 [R]

Blackburn, E. H. 2005. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters* 579: 859–862. [R]

Blasco, M. A. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chem. Biol.* 3: 640–649. [R]

Espinoza, C. A. and B. Ren. 2011. Mapping higher order structure of chromatin domains. *Nature Genet.* 43: 615–616. [R]

Gilson, E. and V. Geli. 2007. How telomeres are replicated. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 825–838. [R]

Jain, D. and J. P. Cooper. 2010. Telomeric strategies: means to an end. *Ann. Rev. Genet.* 44: 243–269. [R]

Kornberg, R. D. 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868–871. [P]

Lampert, F. and S. Westermann. 2011. A blueprint for kinetochores—new insights into the molecular mechanics of cell division. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 407–412. [R]

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260. [P]

Morris, C. A. and D. Moazed. 2007. Centromere assembly and propagation. *Cell* 128: 647–650. [R]

Ohta, S., L. Wood, J.-C. Bukowski-Wills, J. Rappsilber and W. C. Earnshaw. 2011. Building mitotic chromosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 114–121. [R]

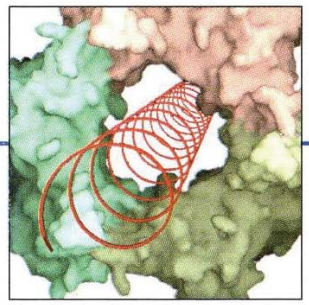
O'Sullivan, R. J. and J. Karlseder. 2010. Telomeres: protecting chromosomes against genomic instability. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 171–181. [R]

Paulson, J. R. and U. K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817–828. [P]

Tremethick, D. J. 2007. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128: 651–654. [R]

Van Holde, K. and J. Zlatanova. 2007. Chromatin fiber structure: where is the problem now? *Sem. Cell Dev. Biol.* 18: 651–658. [R]

Verdaasdonk, J. S. and K. Bloom. 2011. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 320–332. [R]



Capítulo 7

Replicación, mantenimiento y reorganización del ADN genómico

Replicación del ADN 217

Reparación del ADN 231

Reorganización del ADN 244

MEDICINA MOLECULAR:
Cáncer de colon y reparación del ADN 241

EXPERIMENTO CLAVE:
Reorganización de los genes de inmunoglobulinas 248

El proceso biológico fundamental de la reproducción requiere la transmisión fiel de la información genética de padres a hijos. Por tanto, resulta esencial la replicación exacta del ADN genómico para la vida de todas las células y organismos. Cada vez que una célula se divide, su genoma completo debe duplicarse, necesitándose una compleja maquinaria para copiar las grandes moléculas de ADN que componen los cromosomas procariotas y eucariotas. Además, las células han desarrollado mecanismos para corregir los fallos que algunas veces se cometen durante la replicación del ADN y para reparar los daños que puedan surgir por la acción de agentes ambientales, como la radiación. Las anormalidades de estos procesos dan como resultado una replicación y un mantenimiento fallido del ADN genómico —un fallo que puede causar consecuencias desastrosas, como el desarrollo de un cáncer.

A pesar de la importancia de la replicación exacta y el mantenimiento del ADN, los genomas celulares no son estáticos. Para que las especies evolucionen, son necesarias mutaciones y reorganizaciones para mantener la variación genética entre los individuos. La recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis desempeña un importante papel en este proceso puesto que permite a los genes parentales reorganizarse en nuevas combinaciones en la siguiente generación. Las reorganizaciones de las secuencias de ADN dentro del genoma se cree que también contribuyen a la evolución mediante la creación de nuevas combinaciones de información genética. Además, algunas reorganizaciones del ADN están programadas para regular la expresión génica durante la diferenciación y el desarrollo de células individuales y organismos. En humanos, un ejemplo destacado es la reorganización de los genes de anticuerpos durante el desarrollo del sistema inmunológico. Un cuidadoso equilibrio entre el mantenimiento y la variación de la información genética resulta, por tanto, crítico tanto para el desarrollo de los organismos individuales como para la evolución de las especies.

VÍDEO 7.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v7.1

Mecanismo de replicación de ADN. En la replicación de ADN, ambos hilos de la doble hélice actúan como plantillas para la formación de nuevas moléculas de ADN, usando dos mecanismos diferentes.

Replicación del ADN

Tal y como explicamos en el Capítulo 4, la replicación del ADN es un proceso semiconservativo en el que cada hebra parental sirve como molde para la síntesis de una nueva hebra hija complementaria. La enzima principal implicada es la ADN polimerasa, que cataliza la unión de los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) para formar la cadena de ADN en crecimiento. Sin embargo, la replicación del ADN es mucho más compleja que una reacción enzimática. Están involucradas otras proteínas, y son necesarios mecanismos de lectura para asegurar que la exactitud de la replicación es compatible con la baja frecuencia

de errores que se permiten en la reproducción celular. También son necesarias proteínas adicionales y secuencias de ADN para iniciar la replicación y para copiar los extremos de los cromosomas eucariotas.

ADN polimerasas

La **ADN polimerasa** se identificó por primera vez en lisados de *E. coli* por Arthur Kornberg en 1956. La capacidad de esta enzima para copiar exactamente una hebra molde de ADN proporciona una base bioquímica para el modelo de replicación del ADN que inicialmente propusieron Watson y Crick, por lo que su aislamiento representó un descubrimiento importante en la biología molecular. Irónicamente, sin embargo, esta primera ADN polimerasa identificada (ahora llamada ADN polimerasa I) no es la enzima principal responsable de la replicación en *E. coli*. En su lugar, ahora está claro que tanto las células procariotas como eucariotas contienen diferentes ADN polimerasas con funciones distintas en la replicación y reparación del ADN. En bacterias, la ADN polimerasa III es la principal polimerasa responsable de la replicación del ADN. Las células eucariotas contienen tres ADN polimerasas (α, δ y ε) que funcionan en la replicación del ADN nuclear. Una ADN polimerasa diferente (γ) se localiza en las mitocondrias y es responsable de la replicación del ADN mitocondrial.

Todas las ADN polimerasas conocidas comparten dos propiedades fundamentales que poseen implicaciones críticas para la replicación del ADN (**Fig. 7.1**). En primer lugar, todas las polimerasas sintetizan ADN sólo en la dirección 5′ a 3′, añadiendo un dNTP al grupo 3′ hidroxilo de una cadena creciente. En segundo lugar, las ADN polimerasas pueden añadir un nuevo deoxirribonucleótido sólo a una hebra cebadora ya existente que se encuen-

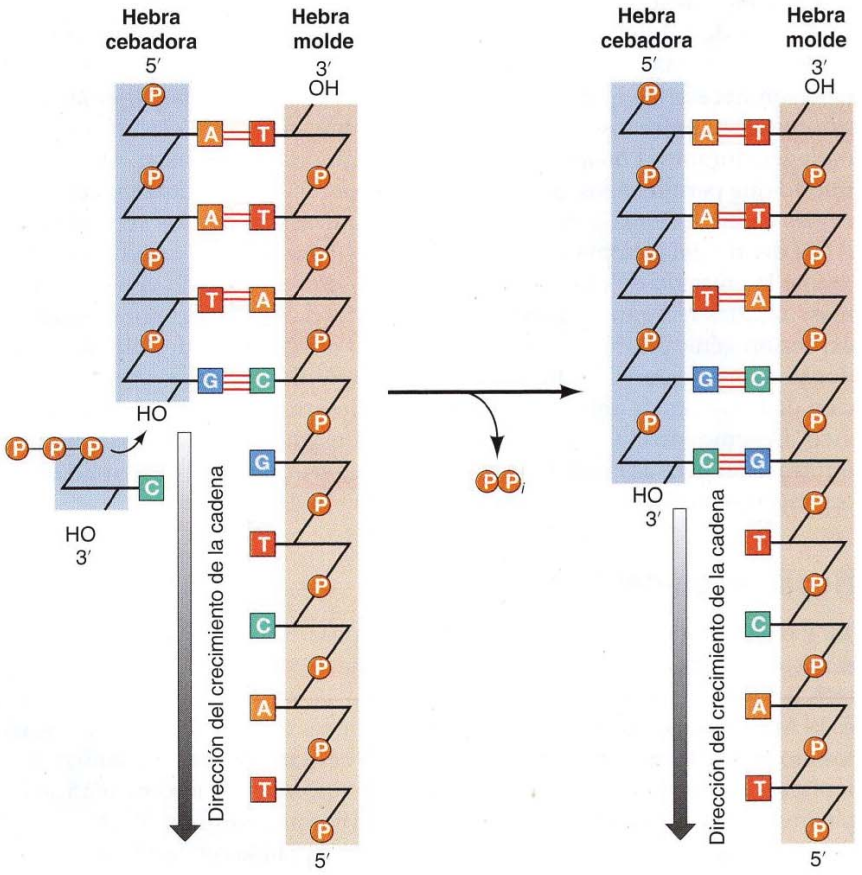


FIGURA 7.1 Reacción catalizada por la ADN polimerasa. Todas las ADN polimerasas conocidas añaden un desoxirribonucleósido trifosfato al grupo 3′ hidroxilo de una cadena de ADN creciente (la hebra cebadora).

tra unida mediante puentes de hidrógeno a una hebra molde; no son capaces de iniciar la síntesis de ADN de *novo* mediante la catálisis de la polimerización de dNTP libres. En este sentido, las ADN polimerasas difieren de las ARN polimerasas, que pueden iniciar la síntesis de una nueva hebra de ARN en ausencia de un cebador. Como se analizará más adelante en este capítulo, estas propiedades de las ADN polimerasas parecen ser críticas para el mantenimiento de la alta fidelidad de la replicación del ADN que es necesaria para la reproducción celular.

Horquilla de replicación

Las moléculas de ADN en proceso de replicación se analizaron por primera vez por John Cairns en experimentos en los que *E. coli* se cultivó en presencia de timidina radiactiva, lo que permitió la visualización por autorradiografía del nuevo ADN replicado (**Fig. 7.2**). En algunos casos, se pueden observar moléculas circulares completas en proceso de replicación. Estas moléculas de ADN contienen dos **horquillas de replicación**, que representan las regiones de la síntesis activa de ADN. En cada horquilla las hebras parentales se separan y son sintetizadas dos nuevas hebras hijas.

La síntesis de dos nuevas hebras de ADN complementarias a las dos hebras de la molécula parental trajo consigo un problema importante para entender la bioquímica de la replicación del ADN. Puesto que las dos hebras de la doble hélice de ADN se disponen en direcciones opuestas (antiparalelas), la síntesis continua de dos nuevas hebras en la horquilla de replicación requeriría que una de las hebras se sintetizara en sentido 5′ a 3′ mientras que la otra se sintetizó en el sentido opuesto (3′ a 5′). Pero la ADN polimerasa cataliza la polimerización de los dNTP solamente en sentido 5′ a 3′. Entonces, ¿cómo puede ser sintetizada la otra hebra de ADN?

El enigma se resolvió mediante experimentos que mostraban que sólo una hebra de ADN se sintetiza de manera continua en la dirección de la replicación del ADN; la otra se forma a partir de pequeñas piezas (1-3 kb) discontinuas de ADN que se sintetizan al revés con respecto al movimiento de la horquilla de replicación (**Fig. 7.3**). Estas pequeñas piezas del nuevo ADN sintetizado (denominados **fragmentos de Okazaki** en honor a su descubridor, el bioquímico japonés Reiji Okazaki) se unen por la acción de la **ADN ligasa**, formando una nueva hebra intacta de ADN. La hebra sintetizada de forma continua se denomina **hebra conductora**, debido a que su elongación

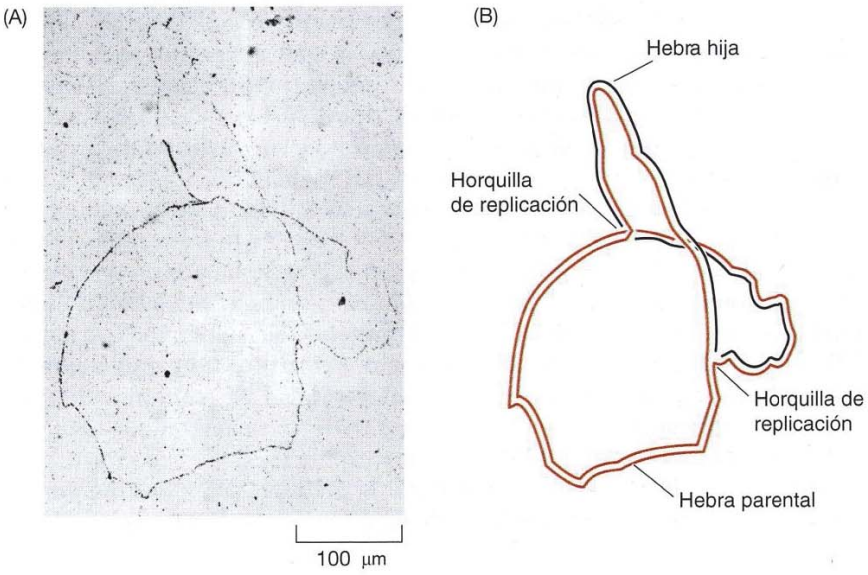


FIGURA 7.2 Replicación del ADN de *E. coli*. (A) Una autorradiografía mostrando las bacterias que crecieron en [^{3}H]timidina durante dos generaciones para marcar el ADN, que se extrajo después para visualizarlo mediante una cinta fotográfica. (B) Este esquema ilustra las dos horquillas de replicación vistas en (A). (De J. Cairns, 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:43.)

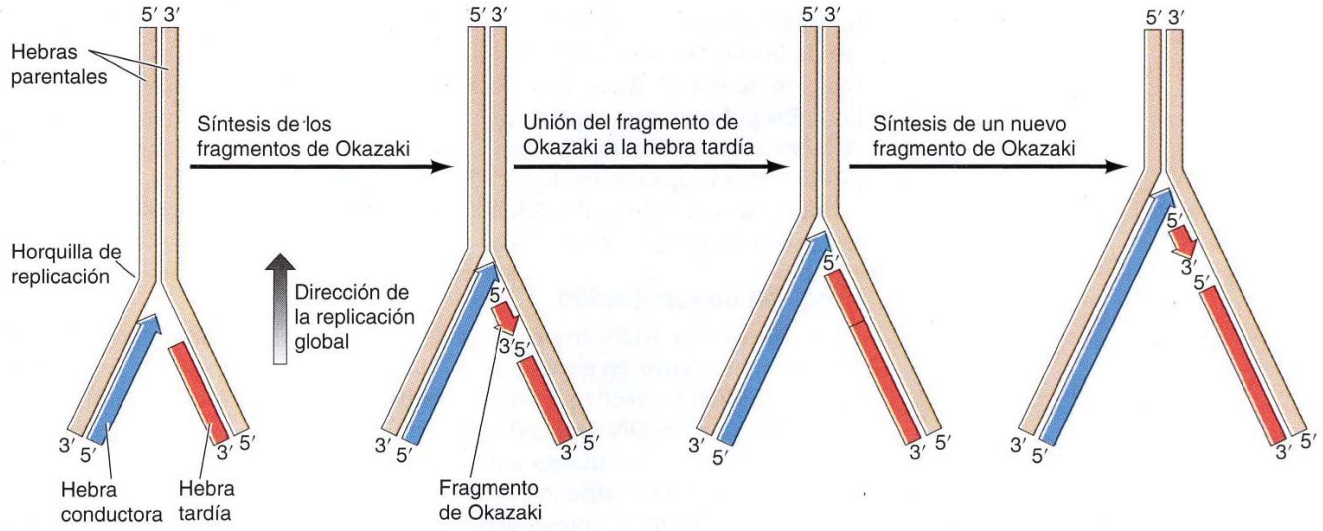


FIGURA 7.3 Síntesis de las hebras conductora y tardía de ADN. La hebra conductora se sintetiza de forma continua en la dirección del movimiento de la horquilla de replicación. La hebra tardía se sintetiza en pequeños fragmentos (fragmentos de Okazaki) en sentido opuesto al resto de la replicación. Los fragmentos de Okazaki se unen después mediante la acción de la ADN ligasa.

en el sentido del movimiento de la horquilla de replicación expone el molde que se utilizará para la síntesis de los fragmentos de Okazaki (**hebra tardía**).

Aunque el descubrimiento de la síntesis discontinua de la hebra rezagada proporciona un mecanismo para la elongación de ambas hebras de ADN en la horquilla de replicación, surgió otra pregunta: Puesto que las ADN polimerasas necesitan un cebador y no son capaces de iniciar la síntesis *de novo*, ¿cómo se inicia la síntesis de los fragmentos de Okazaki? La respuesta son los fragmentos cortos de ARN que sirven como iniciadores para la replicación del ADN (**Fig. 7.4**). Al contrario que la síntesis de ADN, la síntesis de ARN es capaz de iniciarse *de novo*, y una enzima llamada **primasa** sintetiza los fragmentos cortos de ARN (p. ej., de tres a diez nucleótidos de longitud) complementarios a la hebra rezagada molde en la horquilla de replicación. Los fragmentos de Okazaki se sintetizan mediante la extensión de estos iniciadores de ARN por la ADN polimerasa. Una consecuencia importante de estos iniciadores de ARN es que los nuevos fragmentos de Okazaki sintetizados contienen una unión ARN-ADN, cuyo descubrimiento proporcionó la evidencia del papel de los iniciadores de ARN en la replicación del ADN.

Para formar una hebra tardía continua de ADN, los iniciadores de ARN deben eliminarse de los fragmentos de Okazaki y ser sustituidos con ADN (**Fig. 7.5**). En procariotas, los cebadores de ARN son eliminados mediante la acción de la polimerasa I. Adicionalmente a su actividad ADN polimerasa, la polimerasa I actúa como una **exonucleasa** capaz de hidrolizar el ADN (o ARN) tanto en la dirección 3′ a 5′ como en la 5′ a 3′. La acción de la polimerasa I como exonucleasa de 3′ a 5′ elimina ribonucleótidos de los extremos 5′ de los fragmentos de Okazaki, permitiendo su sustitución con deoxirribonucleótidos para dar lugar a fragmentos constituidos completamente por ADN. En células eucariotas, los cebadores de ARN son eliminados por la acción combinada de la **ARNasa H**, una enzima que degrada la hebra de ARN de los híbridos ARN-ADN, y es una exonucleasa en dirección 5′ a 3′. Los huecos resultantes son rellenados por la polimerasa δ y los fragmentos de ADN son unidos mediante la ADN ligasa, generando una hebra tardía intacta.

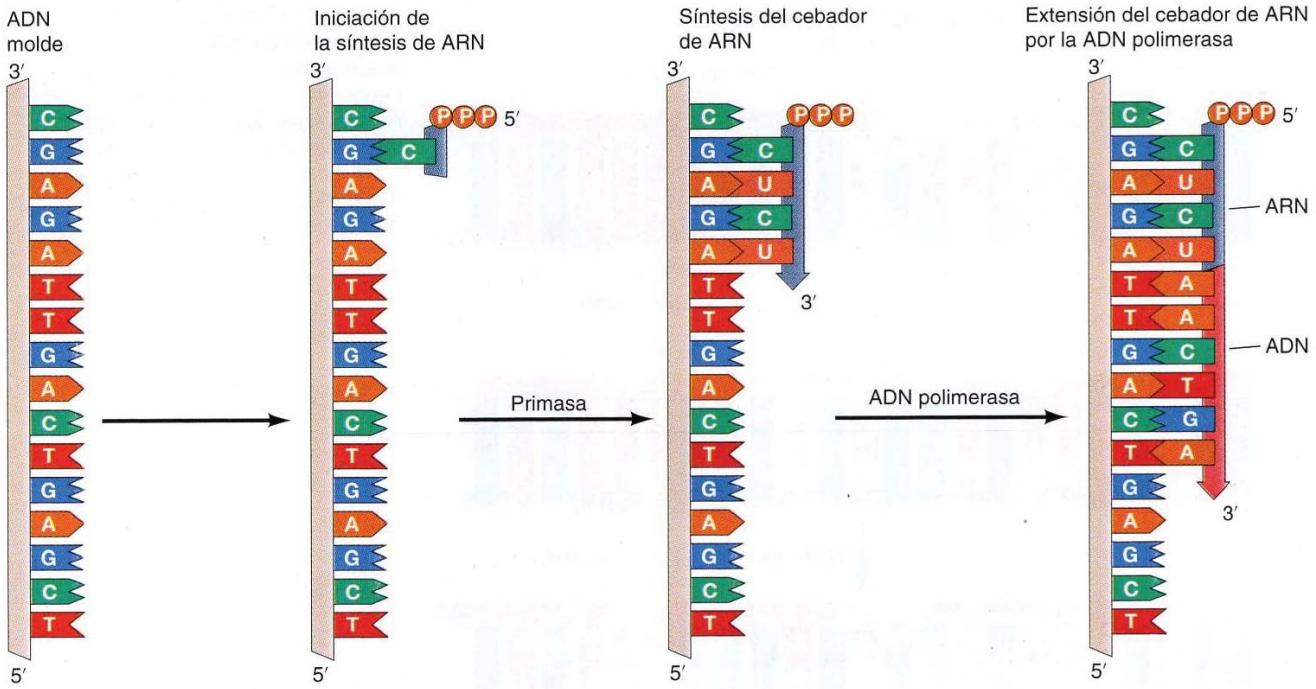


FIGURA 7.4 Origen de los fragmentos de Okazaki con cebadores de ARN. Fragmentos cortos de ARN sirven como iniciadores sobre los que puede actuar la ADN polimerasa.

Como se indicó anteriormente, las diferentes ADN polimerasas juegan diferentes papeles en el horquilla de replicación tanto en células procariotas como eucariotas (**Fig. 7.6**). En *E. coli*, la polimerasa III es la principal polimerasa replicativa, funcionando en la síntesis tanto de la hebra conductora de ADN y de los fragmentos de Okazaki mediante la extensión de cebadores de ARN. En células eucariotas, tres ADN polimerasas distintas (α, δ y ε) están implicadas en la replicación del ADN nuclear. Los papeles de estas ADN polimerasas han sido estudiados en dos tipos de experimentos. En primer lugar, la replicación del ADN de algunos virus animales, como el SV40, puede estudiarse en extractos acelulares, permitiendo un análisis bioquímico directo de las actividades de las distintas ADN polimerasas además de otras proteínas implicadas en la replicación del ADN. En segundo lugar, las polimerasas α, δ y ε se encuentran en levaduras además de en células de mamífero, permitiendo el uso de las potentes técnicas de genética de levaduras (véase Cap. 4) para analizar sus papeles biológicos. El análisis bioquímico ha establecido que la polimerasa α se encuentra formando un complejo con la primasa, y funciona junto con la primasa para sintetizar fragmentos cortos de ARN-ADN durante la síntesis de la hebra tardía y en los orígenes de replicación. A continuación, las polimerasas δ y ε actúan como las principales polimerasas en la replicación que se ocuparían de la síntesis de las hebras conductora y tardía, respectivamente.

No sólo las polimerasas y las primasas actúan en la horquilla de replicación sino que participan otras muchas proteínas. Estas proteínas adicionales se han identificado mediante el análisis de mutantes de *E. coli* y levaduras deficientes en la replicación del ADN y la purificación de proteínas de mamíferos necesarias para la replicación *in vitro* del ADN de SV40. Una clase de proteínas necesarias para la replicación se unen con las ADN polimerasas, aumentando la actividad de las polimerasas y manteniéndolas unidas al molde de ADN para que continúen la síntesis de la nueva hebra de ADN. Tanto la polimerasa III de *E. coli* como las polimerasas δ y ε de eucariotas están asociadas a proteínas de enganche deslizante (antígeno nuclear de células proliferativas [PCNA] en eucariotas) que sitúan a la polimerasa en el cebador y

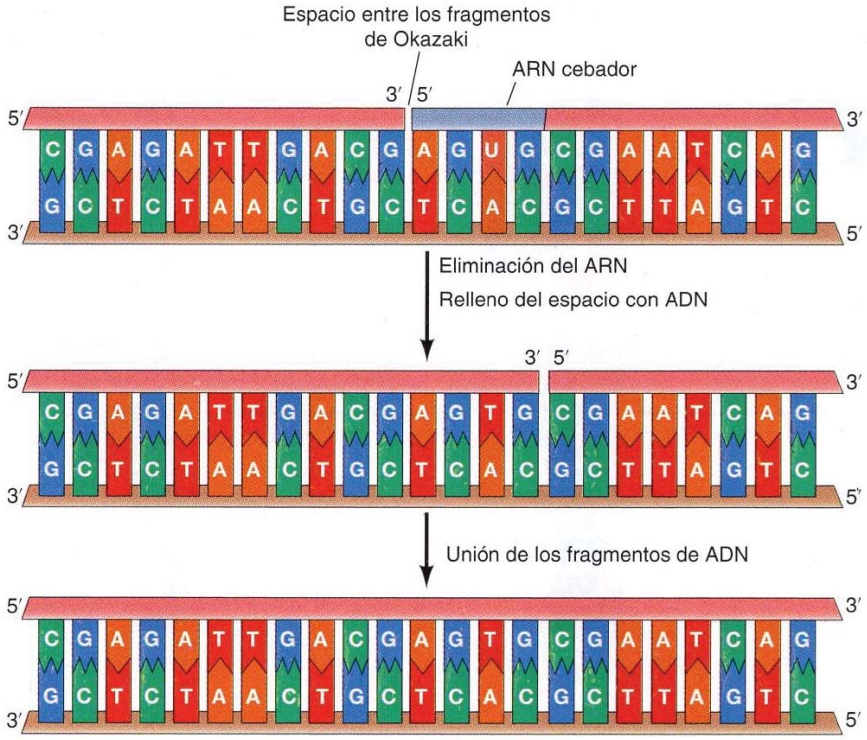


FIGURA 7.5 Eliminación de los cebadores de ARN y unión de los fragmentos de Okazaki. Los cebadores de ARN se eliminan y la ADN polimerasa rellena los espacios entre los fragmentos de Okazaki con ADN. Los fragmentos de ADN resultantes son unidos con posterioridad por la ADN ligasa.

mantienen su asociación estable con el molde (**Fig. 7.7**). Las proteínas de enganche de carga (factor de replicación C [RFC] en eucariotas) fijan a las proteínas de enganche deslizante al ADN en la zona de unión del cebador y el molde. Las proteínas de enganche de carga utilizan energía generada por hidrólisis del ATP para abrir los enganches deslizantes. A continuación, libera a la proteína de enganche deslizante, que forma un anillo en torno al ADN que actúa como molde. La proteína de enganche deslizante asocia a la ADN polimerasa con el ADN en el punto de intersección entre el cebador y el molde. El anillo formado por el enganche deslizante mantiene la asociación de la polimerasa con su molde conforme avanza la replicación, lo que hace posible la síntesis ininterrumpida de miles de nucleótidos de ADN.

Otras proteínas desenrollan la hebra molde de ADN y estabilizan regiones de una sola hebra (**Fig. 7.8**). Las **helicasas** son enzimas que catalizan el

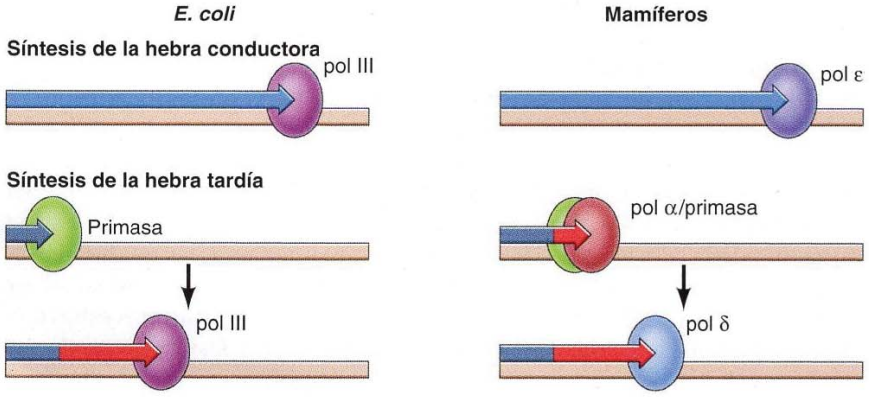
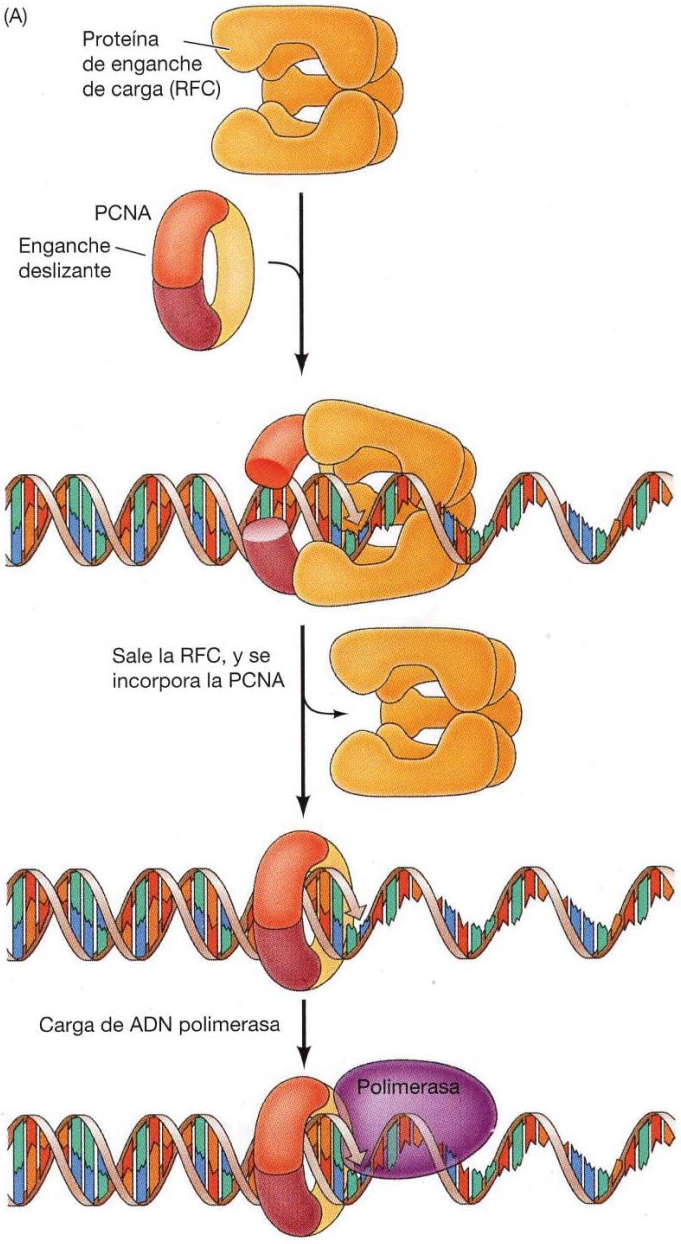


FIGURA 7.6 Papel de las ADN polimerasas en *E. coli* y en células de mamíferos. La hebra conductora es sintetizada por la polimerasa III (pol III) en *E. coli* y por la polimerasa ε (pol ε) en las células de los mamíferos. En *E. coli*, una primasa inicia la síntesis de la hebra tardía (rojo), siendo leídos los iniciadores de ARN por la polimerasa III. En las células de los mamíferos, la síntesis de la hebra tardía la lleva a cabo un complejo de primasa y polimerasa α (pol α). Los fragmentos cortos de ARN-ADN sintetizados por el complejo son leídos por la polimerasa δ.



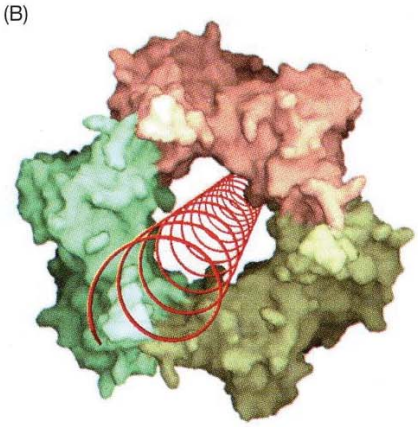


FIGURA 7.7 Proteínas accesorias a la polimerasa. (A) Un complejo de proteínas de enganche de carga y enganche deslizante (RFC y PCNA en células de mamífero, respectivamente) se une al ADN en la intersección entre el cebador y el molde. Entonces RFC se libera, reclutando PCNA al ADN. A continuación la ADN polimerasa se une al PCNA. (B) Modelo de PCNA unido al ADN. (B, de T. S. Krishna y cols., 1994. *Cell* 79: 1233.)

desenrollamiento del ADN parental, emparejadas con la hidrólisis de ATP, a la cabeza de la horquilla de la replicación. **Proteínas de unión al ADN monocatenario** (p. ej., el factor de replicación A eucariota [RFA]) estabilizan la hebra molde de ADN desenrollada, manteniéndola en un estado de hebra única extendida para que sea copiada por la polimerasa.

A medida que las hebras parentales se desenrollan, el ADN a la cabeza de la horquilla de replicación está siendo forzado a girar. Sin restricciones, esta rotación causaría que las moléculas de ADN circular (como el ADN de SV40 o el cromosoma de *E. coli*) se enrollaran sobre sí mismas, bloqueando eventualmente la replicación (**Fig. 7.9**). Este problema lo resuelven las **topoisomerasas**, enzimas que catalizan la rotura reversible y la unión de las hebras de ADN. Existen dos tipos de estas enzimas: Topoisomerasas de tipo I, que rompen solo una hebra de ADN y topoisomerasas de tipo II, que introducen roturas simultáneas en ambas hebras. Las roturas introducidas

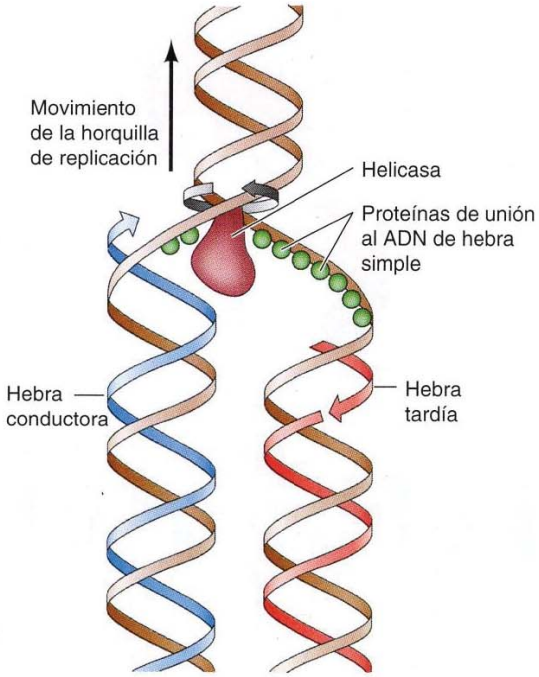


FIGURA 7.8 Acción de la helicasa y las proteínas de unión al ADN de hebra simple. Las helicasas desenrollan las dos hebras del ADN parentales situadas en la cabeza de la horquilla de replicación. Las hebras de ADN desenrolladas son estabilizadas por las proteínas de unión al ADN de hebra simple de manera que puedan servir como moldes para la síntesis de un nuevo ADN.

por los tipos I y II de las topoisomerasas sirven como ejes de giro que permiten a las dos hebras molde de ADN rotar o pivotar libremente alrededor de la otra de manera que la replicación puede continuar sin el enrollamiento del ADN a la cabeza de la horquilla (véase Fig. 7.9). Aunque los cromosomas eucariotas están compuestos por moléculas de ADN lineales en lugar de circulares, su replicación también requiere topoisomerasas; si no los cromosomas completos tendrían que rotar continuamente durante la síntesis de ADN.

La topoisomerasa de tipo II es necesaria no solo para desenrollar el ADN sino también para separar las nuevas moléculas replicadas de ADN circular que aparecen entrelazadas las unas con las otras. En las células eucariotas, la topoisomerasa II parece estar involucrada en la condensación mitótica de los cromosomas. Además, estudios realizados en levaduras mutantes, así como experimentos en *Drosophila* y células de mamíferos, indican que la topoisomerasa II es necesaria para la separación de las cromátidas hijas durante la mitosis, sugiriendo que desempeña una función de desenrollamiento de los lazos de nueva replicación del ADN en los cromosomas de eucariotas.

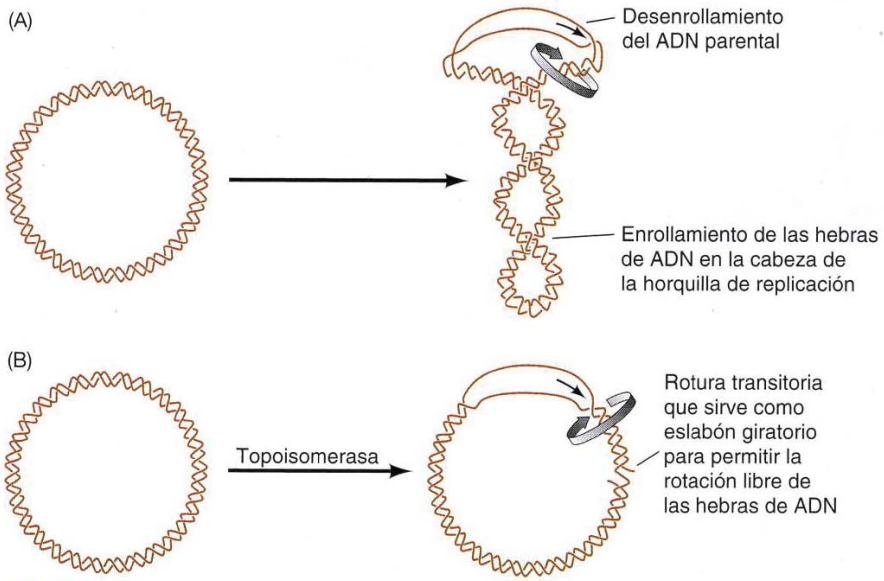


FIGURA 7.9 Acción de las topoisomerasas durante la replicación del ADN. (A) Una vez que las dos hebras de ADN están desenrolladas, el ADN que se encuentra en la cabeza de la horquilla de replicación es forzado a rotar en dirección opuesta, de forma que las moléculas circulares se enrollan sobre sí mismas. (B) Este problema lo resuelven las topoisomerasas, que catalizan la rotura y la unión reversibles de las hebras de ADN. Las roturas transitorias introducidas por estas enzimas actúan como eslabones giratorios que permiten a las dos hebras de ADN rotar libremente una sobre otra.

◆ Un inhibidor de la topoisomerasa II, un principio activo denominado etopósido, se emplea como agente quimioterapéutico para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (véase Cap. 19).

ANIMACIÓN 7.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a7.1

Horquilla de replicación del ADN. La helicasa, primasa y dos moléculas de ADN polimerasa III llevan a cabo la síntesis coordinada tanto de la hebra conductora como de la tardía del ADN en la horquilla de replicación.

Las enzimas implicadas en la replicación del ADN actúan de forma coordinada para sintetizar las hebras conductora y tardía de ADN simultáneamente en la horquilla de replicación (**Fig. 7.10**). Esta tarea se logra por medio de la formación de dímeros de las polimerasas (replicativas) de ADN acompañadas de subunidades de la proteína de enganche de carga, la cual se asocia también a una helicasa en la horquilla de replicación. A continuación, una molécula de polimerasa ADN sintetiza la hebra adelantada, mientras que la otra se ocupa de la síntesis de la hebra tardía. El molde de la hebra tardía se repliega en la horquilla de replicación de tal modo que la subunidad de la polimerasa encargada de su síntesis avanza en la misma dirección que la otra subunidad que fabrica la hebra conductora. La polimerasa que participa en la síntesis de la hebra tardía se separa de la hebra de ADN al llegar al final de un fragmento de Okazaki. Continúa asociada a la proteína de carga, por lo que se puede unir de nuevo con gran eficiencia a una nueva proteína de enganche de deslizamiento en la interesección del cebador y el molde para comenzar a sintetizar otro fragmento de Okazaki.

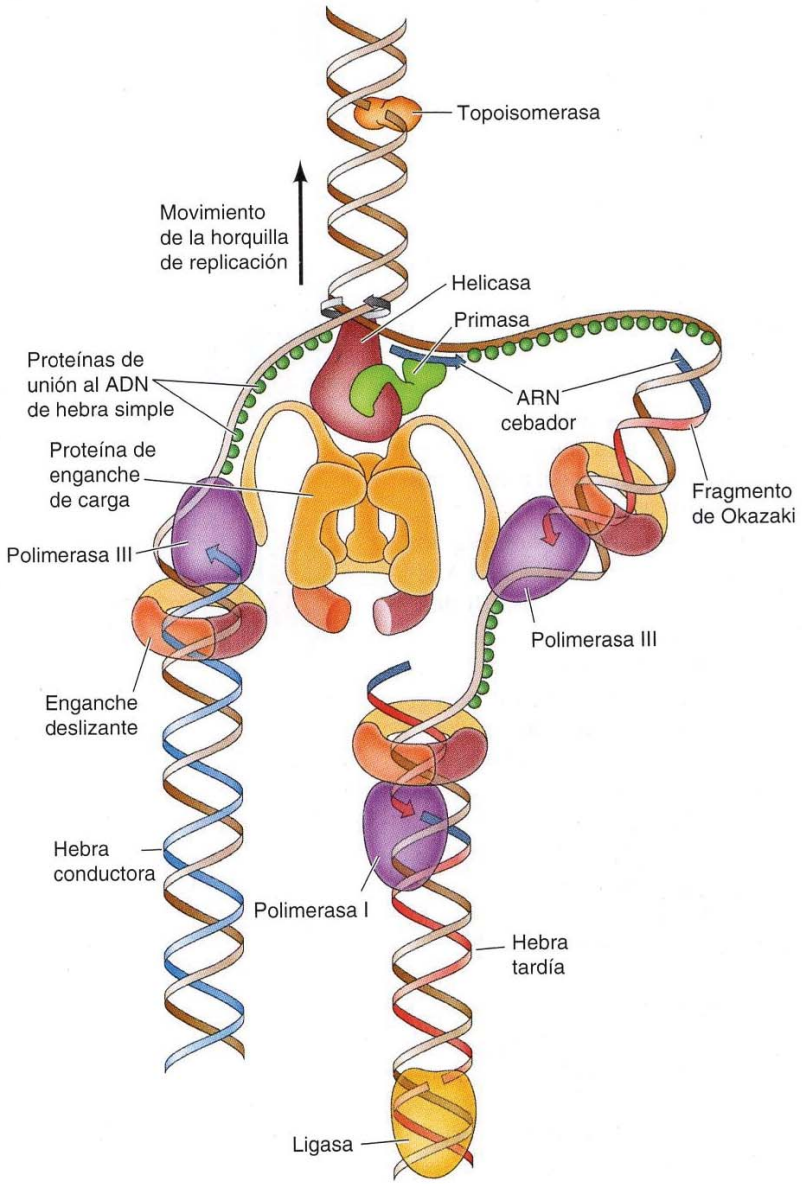


FIGURA 7.10 Modelo de la horquilla de replicación de *E. coli*. Una helicasa, una primasa y dos moléculas de ADN polimerasa III llevan a cabo la síntesis coordinada de las hebras conductora y tardía del ADN. Ambas moléculas de la polimerasa de ADN forman un complejo con la proteína de enganche de carga, que se encuentra unida a la helicasa en la horquilla de replicación. La topoisomerasa actúa como un eslabón giratorio en la cabeza de la horquilla, y la polimerasa I junto con una ligasa eliminan los cebadores de ARN y unen los fragmentos de Okazaki por detrás de la horquilla.

En las células eucariotas, los nucleosomas también son desorganizados durante la replicación del ADN. Los nucleosomas de la cromatina parental se dividen entre las dos hebras hijas de ADN, y nuevas histonas son añadidas para volver a ensamblar los nucleosomas por parte de proteínas adicionales (factores de ensamblaje de cromatina) que viajan junto con la horquilla de replicación.

Fidelidad de replicación

La exactitud de la replicación del ADN es crítica para la reproducción celular, y las estimaciones de mutación para una variedad de genes indican que la frecuencia de errores durante la replicación corresponde a menos de una base incorrecta por cada 10^9 nucleótidos incorporados. Esta frecuencia de error es mucho menor que la predicha simplemente a causa del apareamiento de las bases complementarias. En particular, las diferencias de energía libre resultantes de cambios entre los enlaces de hidrógeno establecidos entre bases emparejadas correcta e incorrectamente, sólo son lo suficientemente grandes como para favorecer la formación de pares de bases emparejadas de aproximadamente una base incorrecta por cada 100 nucleótidos. Como consecuencia, la selección de las bases determinada simplemente por los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias, resultaría en una frecuencia de error correspondiente a la incorporación de aproximadamente una base incorrecta en cada 100 nucleótidos de ADN recién sintetizados. El mayor grado de fidelidad realmente alcanzado es el resultado de las actividades de la ADN polimerasa.

Uno de los mecanismos por los que la ADN polimerasa aumenta la fidelidad de la replicación es ayudando a seleccionar la base correcta para la inserción en el nuevo ADN sintetizado. La polimerasa no solo cataliza la incorporación de cualquier nucleótido unido por un puente de hidrógeno a la hebra molde. En su lugar, discrimina activamente en contra de la incorporación de una base desapareada, presumiblemente mediante la adaptación de la conformación de un par de bases correcto. El mecanismo molecular responsable de la capacidad de las ADN polimerasas para seleccionar en contra de bases incorrectas aún no se ha descifrado, pero esta selección parece aumentar la exactitud de la replicación alrededor de cien veces, reduciendo la frecuencia de error esperada de aproximadamente 10^{-5}.

El otro mecanismo principal responsable de la exactitud de la replicación del ADN es la actividad de **doble lectura** de la ADN polimerasa. Las ADN polimerasas replicativas (polimerasas eucariotas δ y ε y polimerasa III de *E. coli*) poseen actividad exonucleasa que puede hidrolizar el ADN en la dirección 3′ a 5′. Esta exonucleasa 3′ a 5′ opera en la dirección contraria a la síntesis de ADN, y participa en la doble lectura del nuevo ADN sintetizado (**Fig. 7.11**). La doble lectura es efectiva porque la ADN polimerasa necesita un cebador y no es capaz de iniciar la síntesis *de novo*. Los iniciadores que están unidos por puentes de hidrógeno al molde son los preferidos para su utilización, así que cuando una base incorrecta es incorporada, se eliminará por la actividad de la exonucleasa 3′ a 5′ en lugar de continuar la síntesis. Las exonucleasas 3′ a 5′ de las ADN polimerasas replicativas escinden selectivamente las bases desapareadas que han sido incorporadas al final de una cadena de ADN en crecimiento, por lo que aumenta la exactitud de la replicación de cien a mil veces más.

La importancia de la doble lectura podría explicar el hecho de que las ADN polimerasas necesitan cebadores y que catalizan el crecimiento de las hebras de ADN solamente en el sentido 5′ a 3′. Cuando el ADN se sintetiza en el sentido 5′ a 3′, la energía necesaria para la polimerización se deriva de la hidrólisis del grupo 5′-trifosfato de un dNTP libre y es añadido al grupo 3′-hidroxilo de la cadena creciente (véase Fig. 7.1). Si el ADN se tuviera que

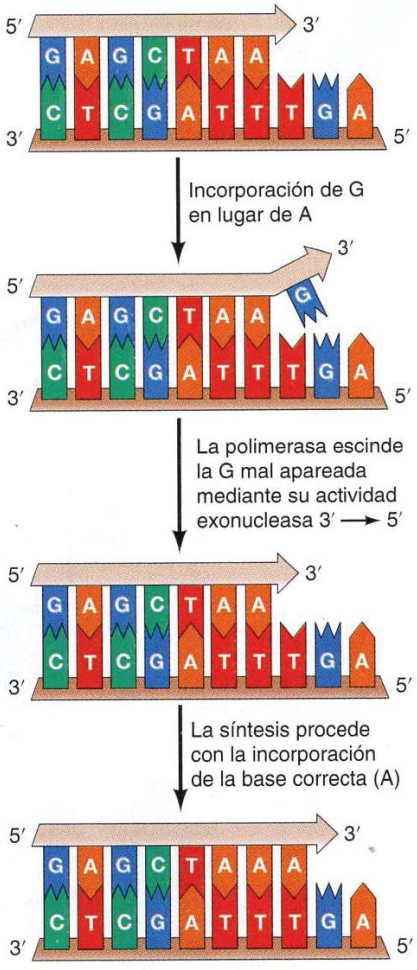


FIGURA 7.11 Doble lectura de la ADN polimerasa. Se incorpora G en lugar de A como resultado de un mal apareamiento con T en la hebra molde. Debido a este mal apareamiento, la G del extremo 3′ terminal no se une mediante enlaces de hidrógeno a la hebra molde. Este error de emparejamiento en el extremo 3′ de la cadena en crecimiento es reconocido y eliminado por la actividad exonucleasa 3′-5′ de la ADN polimerasa, quien necesita para continuar la síntesis un cebador unido por puentes de hidrógeno a la hebra molde. Tras la escisión de la G desapareada, la síntesis de ADN continúa con la incorporación de la base correcta (A).

extender en sentido 3′ a 5′, la energía de polimerización tendría que derivarse de la hidrólisis del grupo 5′-trifosfato del nucleótido terminal recién incorporado al ADN. Esto eliminaría la posibilidad de la doble lectura, debido a que la eliminación de un nucleótido terminal desapareado también eliminaría al grupo 5′-trifosfato necesario como fuente de energía para la elongación de la cadena. Por tanto, aunque la capacidad de la ADN polimerasa para extender un cebador en sentido 5′ a 3′parece hacer a la replicación un proceso complicado, resulta necesario para asegurar la duplicación exacta del material genético.

Combinada con la capacidad de discriminar en contra de la inserción de bases desapareadas, la actividad de doble lectura de las ADN polimerasas es suficiente para reducir la frecuencia de error de replicación a alrededor de una base desapareada por cada 10^7 a 10^8. Mecanismos adicionales (discutidos en la sección «Reparación del ADN») actúan para eliminar las bases desemparejadas que han sido incorporadas en el nuevo ADN sintetizado, lo que supone una reducción adicional de la tasa de errores por debajo de 10^{-9}.

Orígenes e iniciación de la replicación

La replicación del ADN procariota y eucariota comienza en una única secuencia llamada **origen de replicación**, que sirve como un sitio específico de unión para proteínas que inician el proceso de replicación. El primer origen descrito fue el de *E. coli*, en cuyo análisis genético mostraba que la replicación siempre empezaba en un único sitio del cromosoma bacteriano. El origen de *E. coli* se ha estudiado en detalle y se sabe que se compone de 245 pares de bases de ADN, elementos que sirven como sitios de unión para las proteínas necesarias para iniciar la replicación del ADN (**Fig. 7.12**). El paso clave es la unión de una proteína iniciadora a secuencias específicas del ADN dentro del origen. La proteína iniciadora comienza desenrollando el origen del ADN y recluta a las otras proteínas implicadas en la síntesis del ADN. La helicasa junto con proteínas de unión al ADN monocatenario continúan desenrollando y presentando al ADN molde, y la primasa inicia la síntesis de las hebras conductoras. Se forman dos horquillas de replicación que se mueven en sentidos opuestos a lo largo del cromosoma circular de *E. coli*.

El origen de la replicación en los virus de animales, como el SV40, se ha estudiado como modelo para la iniciación de la síntesis en eucariotas. SV40 presenta un solo origen de replicación (consiste en 64 pares de bases) que funciona tanto en células infectadas como en sistemas libres de células. La

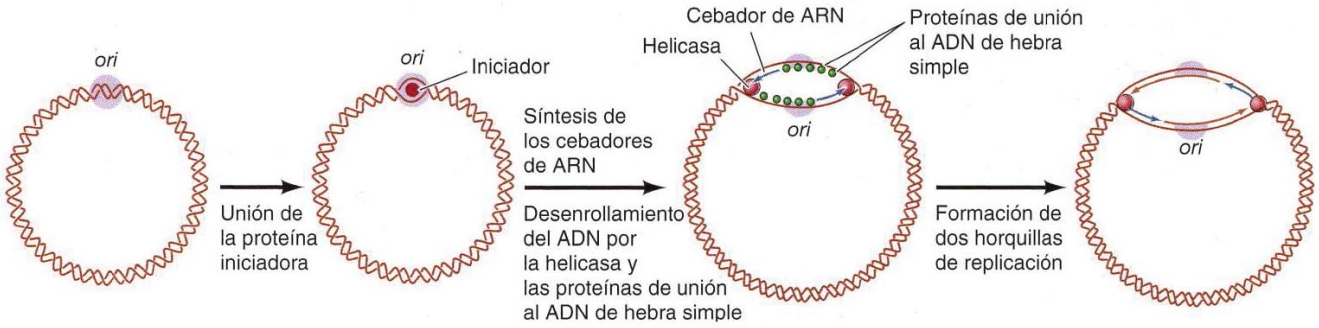


FIGURA 7.12 Origen de la replicación de *E. coli*. La replicación se inicia en un único sitio del cromosoma de *E. coli*, denominado origen (*ori*). El primer acontecimiento es la unión de una proteína iniciadora al ADN *ori*, que conduce el desenrollamiento parcial del molde. El ADN continúa desenrollándose debido a la acción de la helicasa y de las proteínas de unión al ADN de hebra simple, mientras que los cebadores son sintetizados por la primasa. Las dos horquillas de replicación formadas en el origen se mueven en direcciones opuestas a lo largo de la molécula de ADN circular.

replicación comienza por una proteína codificada por el virus (llamada antígeno T) que se une al origen y que actúa como helicasa. Se requiere una proteína de unión al ADN monocatenario para estabilizar a la hebra molde desenrollada, y un complejo ADN polimerasa α-primasa comienza entonces la síntesis de ADN.

Aunque resulta suficiente un solo origen para dirigir la replicación de genomas bacterianos y virales, se necesitan múltiples orígenes para replicar los genomas más largos de las células eucariotas en un período de tiempo razonable. Por ejemplo, el genoma completo de *E. coli* (4×10^6 pares de bases) se replica partiendo de un solo origen en unos 30 minutos. Si los genomas de mamíferos (3×10^9 pares de bases) se replicaran a partir de un solo origen esto requeriría alrededor de 3 semanas (30.000 minutos). El problema se exacerba por el hecho de que el ritmo de la replicación del ADN en las células de mamíferos es diez veces menor que en *E. coli*, posiblemente como resultado del empaquetamiento del ADN eucariota en cromatina. No obstante, el genoma de las células de mamíferos se replica en pocas horas, necesitando el uso de miles de orígenes de replicación.

La presencia de múltiples orígenes de replicación en las células eucariotas se demostró por primera vez mediante la exposición de un cultivo de células de mamíferos a timidina radiactiva durante intervalos de tiempo diferentes, seguido de una autorradiografía para detectar el ADN recién sintetizado. Los resultados de estos estudios indicaron que la síntesis de ADN se inicia en múltiples sitios, desde donde se prosigue en ambas direcciones a lo largo del cromosoma (**Fig. 7.13**). Los orígenes de replicación de las células de mamíferos se encuentran separados por intervalos de 50 a 300 kb aproximadamente; por lo que el genoma humano tiene alrededor de 30.000 orígenes de replicación. Los genomas de eucariotas simples también tienen múltiples orígenes; por ejemplo, la replicación en levaduras se inicia en orígenes separados por unas 40 kb.

Los orígenes de replicación de los cromosomas eucariotas han sido estudiados en levaduras *S. cerevisiae*, en las que se han identificado como secuencias que pueden soportar la replicación de plásmidos en células transformadas (**Fig. 7.14**). Esto ha proporcionado un ensayo funcional para estas secuencias, y el aislamiento de otros muchos elementos (llamados **secuencias de replicación autónoma**, o **ARS**, por las siglas del inglés *autonomously replicating sequences*). El papel de los orígenes de replicación se ha verificado por un análisis bioquímico directo, no solo en plásmidos sino también en el ADN cromosómico de levaduras.

Los elementos funcionales ARS se expanden alrededor de 100 pares de bases, incluyendo una secuencia central de 11 pares de bases común a muchos ARS diferentes (**Fig. 7.15**). Esta secuencia central es esencial para la

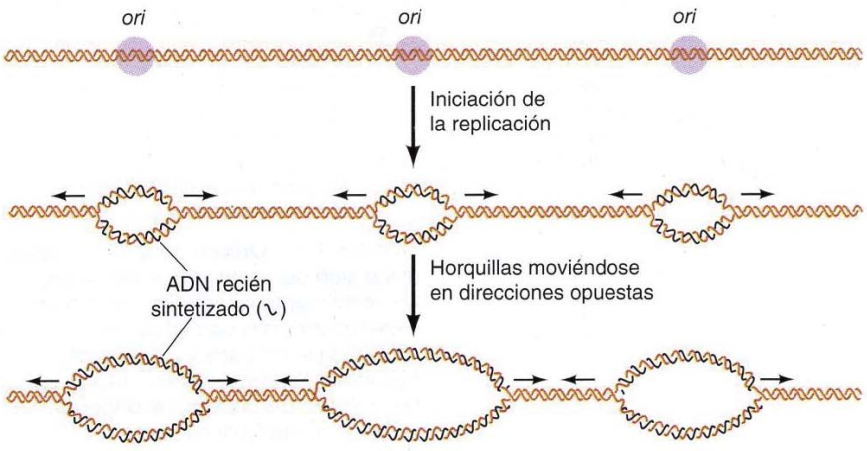


FIGURA 7.13 Orígenes de replicación en los cromosomas eucariotas. La replicación se inicia en múltiples orígenes (*ori*), cada uno de los cuales produce dos horquillas de replicación.

función de los elementos ARS y se sabe que es el sitio de unión para un complejo (llamado **complejo del origen de replicación**, o **ORC**, *origin replication complex*) que es necesario para la iniciación de la replicación del ADN en los orígenes de las levaduras. El complejo ORC parece reclutar a otras proteínas (incluidas la MCM ADN helicasas) en el origen, lo que conduce a iniciar la replicación. El mecanismo de iniciación de la replicación del ADN en levaduras parece, por tanto, similar al de los virus procariotas y eucariotas; es decir, una proteína de iniciación se une a secuencias de ADN concretas que definen un origen de replicación.

Estudios subsiguientes han demostrado que el papel de las proteínas ORC como iniciadores de la replicación está conservado en todos los euca-

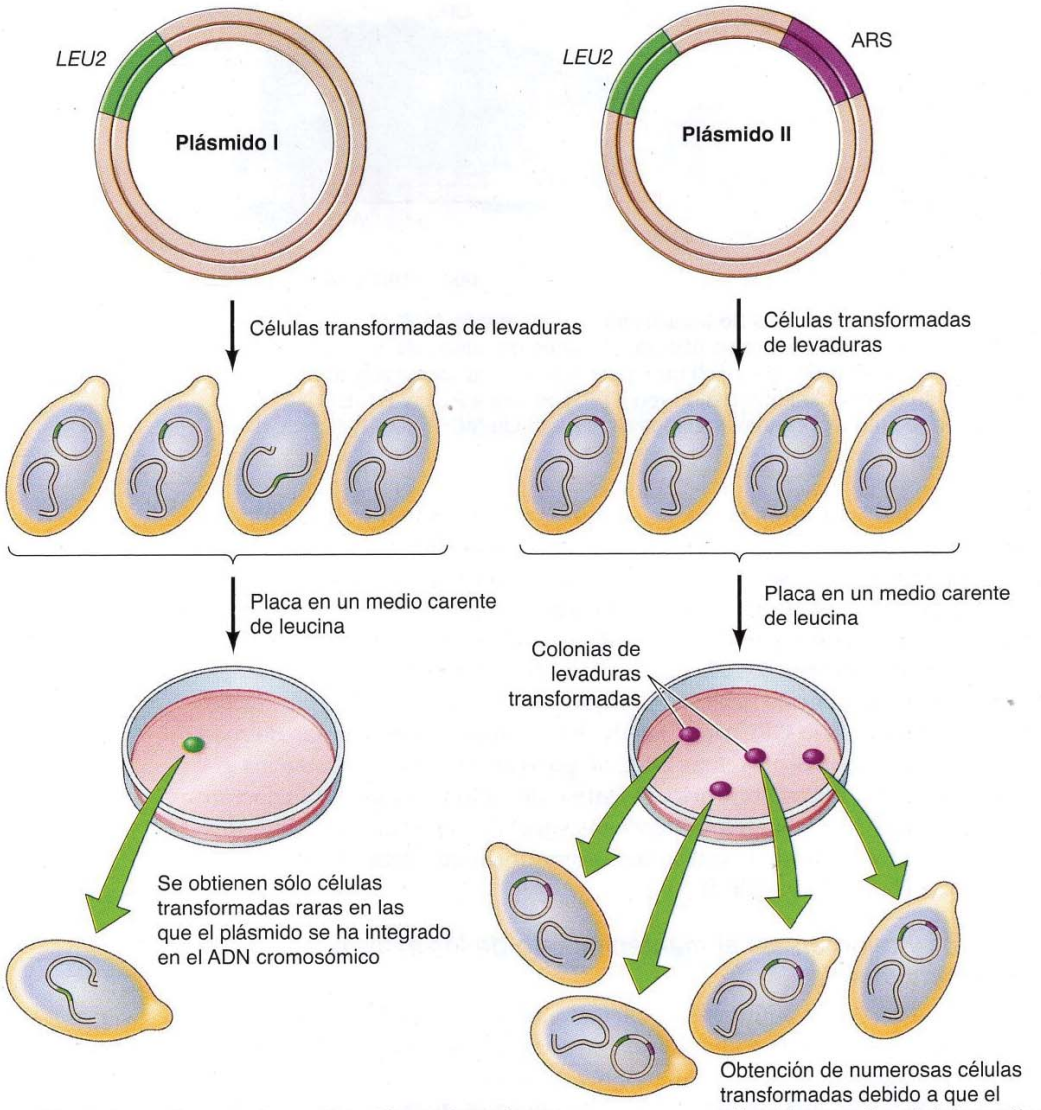


FIGURA 7.14 Identificación de los orígenes de replicación en levaduras. Los plásmidos I y III contienen un gen marcador selectivo (*LEU2*) que permite a las células transformadas crecer en un medio carente de leucina. Solamente el plásmido II contiene un origen de replicación (ARS). La transformación de las levaduras con el plásmido I produce exclusivamente células transformadas raras en las que el plásmido se ha integrado en el ADN cromosómico. El plásmido II, sin embargo, es capaz de replicarse sin la integración en el cromosoma de la levadura (replicación autónoma), de manera que se obtiene un número mayor de células transformadas a partir de su introducción en las células de levaduras.

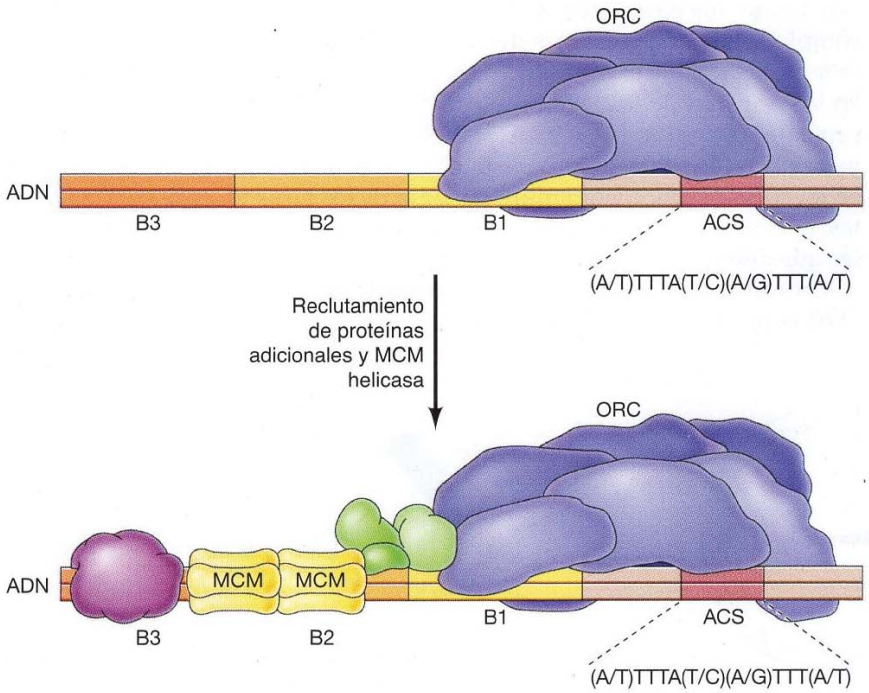


FIGURA 7.15 Elemento ARS de levaduras. Un elemento ARS de *S. cerevisiae* contiene una secuencia consenso ARS de 11 pares de bases (ACS), y tres elementos adicionales (B1, B2 y B3) que contribuyen al funcionamiento del origen. El complejo de reconocimiento del origen (ORC) se une a ACS y B1. ORC a continuación recluta a proteínas adicionales, incluida la MCM ADN helicasa, al origen.

riotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Sin embargo, los orígenes de replicación de otros eucariotas están mucho peor definidos que los elementos ARS de *S. cerevisiae*. En la levadura de fisión *S. pombe*, las secuencias de origen se encuentran dispersas sobre aproximadamente 0,5 y 1 kb de ADN. Los orígenes de *S. pombe* carecen del sitio de unión claramente definido para ORC que poseen los elementos ARS de *S. cerevisiae*, pero contienen repeticiones de secuencias ricas en A/T que parecen actuar como puntos de unión para el complejo ORC de *S. pombe*. En *Drosophila* y en células de mamífero, sin embargo, las proteínas ORC no parecen reconocer secuencias específicas de ADN. Por el contrario, los sitios de unión de ORC e iniciación de la replicación de ADN en los eucariotas superiores puede estar determinada por características de la estructura cromatínica que deberán ser dilucidadas mediante investigación futura.

Telómeros y telomerasa: el mantenimiento de los extremos de los cromosomas

Debido a que las ADN polimerasas sólo extienden los cebadores en sentido de 5′ a 3′, son incapaces de copiar los extremos 5′ de las moléculas lineales de ADN. Como consecuencia, se requieren mecanismos especiales para replicar las secuencias terminales de los cromosomas lineales de las células eucariotas. Estas secuencias (**telómeros**) se componen de repeticiones en tándem de secuencias simples de ADN (véase Cap. 6). Son replicadas por la acción de una enzima única llamada **telomerasa**, que es capaz de mantener a los telómeros catalizando de su síntesis en ausencia de una hebra molde de ADN.

La telomerasa es una **transcriptasa inversa**, una de las clases de las ADN polimerasas, descubiertas por primera vez en retrovirus (véase Cap. 4), que sintetizan ADN a partir de un molde de ARN. Cabe destacar que la telome-

rasa porta su propio molde de ARN, que es complementario a las secuencias repetidas de los telómeros, como parte del complejo enzimático. El uso de este ARN como molde permite a la telomerasa generar múltiples copias de las secuencias repetidas teloméricas, manteniendo por tanto a los telómeros en la ausencia de un molde de ADN convencional para dirigir su síntesis.

El mecanismo de acción de la telomerasa fue descubierto en 1985 por Carol Greider y Elizabeth Blackburn con los estudios del protozoo *Tetrahymena* (**Fig. 7.16**). La telomerasa de *Tetrahymena* está unida a un ARN de 159-nucleótidos de longitud que incluye la secuencia 3′-AACCCCAAC-5′. Esta secuencia es complementaria a la repetición telomérica de *Tetrahymena* (5′-TTGGGG-3′) y sirve como molde para la síntesis del ADN telomérico. La utilización de este ARN como molde permite a la telomerasa extender al extremo 3′ del ADN cromosómico una unidad de repetición detrás de su longitud original. La hebra complementaria puede ser entonces sintetizada por el complejo polimerasa α-primasa utilizando como iniciador al ARN convencional. La eliminación de los ARN cebadores deja un extremo 3′ del ADN cromosómico suelto, que puede formar lazos al final de los cromosomas eucariotas (véase Fig. 6.28).

La telomerasa ha sido identificada en una gran variedad de eucariotas, y los genes codificadores de los ARN de ésta se han clonado en *Tretahymena*, levaduras, ratones y humanos. En cada caso, el ARN de la telomerasa contiene secuencias complementarias a la secuencia telomérica repetida de este organismo (véase Tabla 6.6). Además, la introducción de genes mutantes del ARN de la telomerasa en levaduras han dado como resultado alteraciones correspondientes a las secuencias cromosómicas teloméricas repetidas, demostrando directamente la función de la telomerasa en el mantenimiento de los extremos de los cromosomas eucariotas.

Los defectos en la telomerasa y el mantenimiento normal de los telómeros se asocian con diversas patologías humanas. La actividad de la telomerasa está regulada en las células en división para mantener los telómeros a su longitud normal. En células humanas, por ejemplo, los telómeros abarcan aproximadamente 10 kb con una protuberancia de una sola hebra 3′ de unas 150-200 bases. Aunque esta longitud se mantiene en las células germinales, la mayoría de las células somáticas no poseen niveles suficientemente elevados de telomerasa para mantener la longitud de sus telómeros durante un número indefinido de divisiones celulares. Como consecuencia, los telómeros gradualmente se acortan a medida que las células envejecen, y este acortamiento finalmente desencadena la muerte celular o senescencia. Es interesante saber que diversos síndromes de envejecimiento prematuro se caracterizan por un tasa anómalamente elevada de pérdida telomérica, y algunas de estas patologías se ha descubierto que están causadas directamente por mutaciones en la telomerasa. Por el contrario, las células cancerosas expresan niveles anormalmente elevados de telomerasa, lo que les permite continuar dividiéndose indefinidamente. Las mutaciones en las secuencias reguladoras que producen un aumento en la expresión de la telomerasa son comunes en algunos cánceres de piel humanos (melanomas), lo que apunta a que valores elevados de telomerasa pueden contribuir directamente al desarrollo de cáncer.

Reparación del ADN

El ADN, como cualquier otra molécula, es capaz de participar en diversas reacciones químicas. Debido a que sólo el ADN sirve de copia permanente del genoma celular los cambios en su estructura tienen más trascendencia que alteraciones en otros componentes celulares, como el ARN o las proteínas. Las mutaciones pueden surgir de la incorporación de bases incorrectas

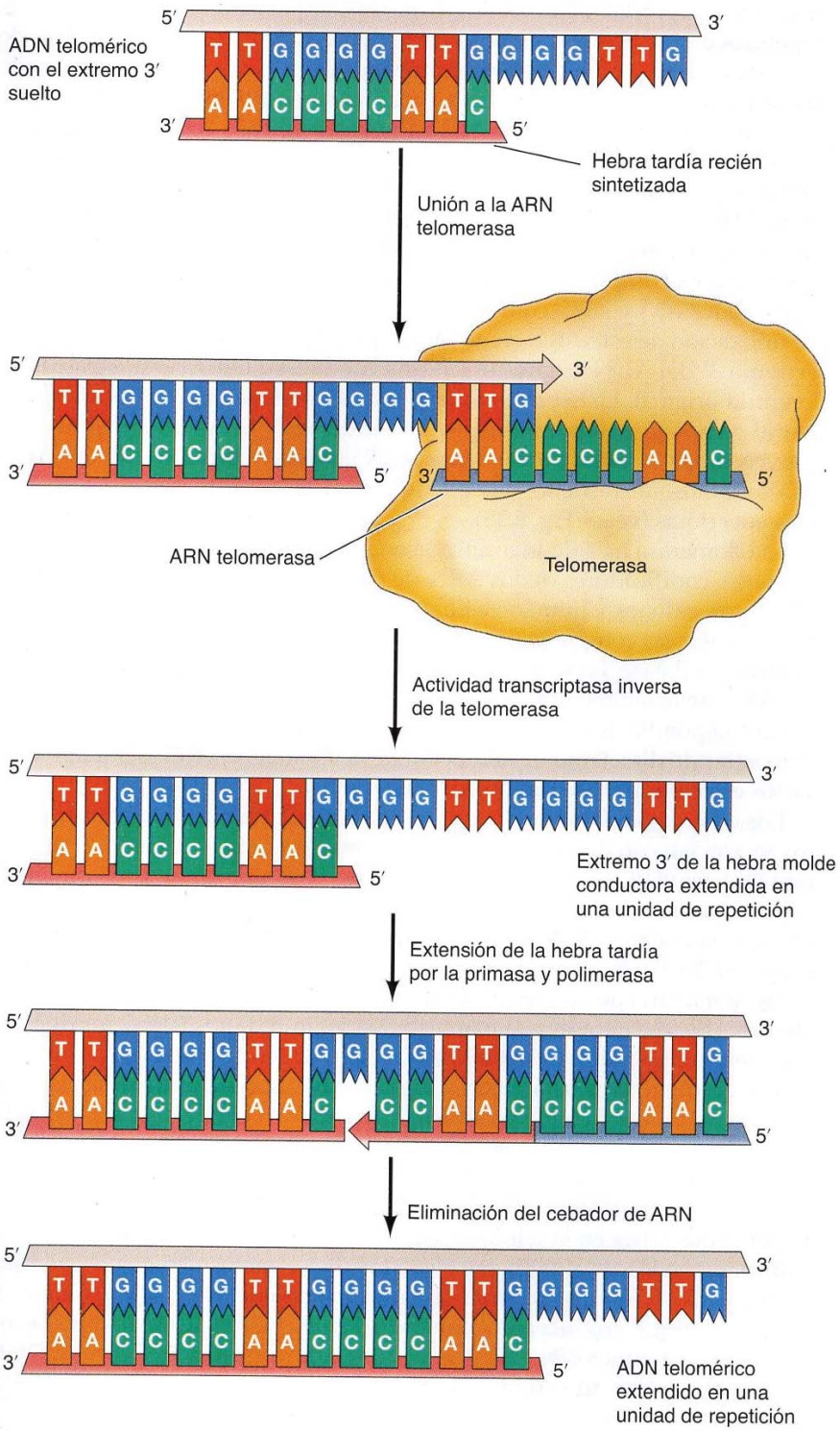


FIGURA 7.16 Acción de la telomerasa. El ADN telomérico es una secuencia repetida simple con un extremo 3′ suelto en la hebra conductora recién sintetizada. La telomerasa lleva consigo su propia molécula de ARN, que es complementaria al ADN telomérico, como parte del complejo enzimático. El extremo suelto del ADN telomérico se une al ARN de la telomerasa, que luego servirá como molde para la extensión de la hebra molde conductora en una unidad más de repetición. La hebra tardía del ADN telomérico puede ser a su vez sintetizada mediante iniciación convencional de ARN y actividad polimerasa del ADN.

durante la replicación del ADN. Además, se producen diversos cambios bien espontáneos (**Fig. 7.17**) o como resultado de la exposición a agentes químicos o radiación (**Fig. 7.18**). Este tipo de daños en el ADN pueden bloquear la replicación o la transcripción, pudiendo dar lugar a una alta frecuencia de mutaciones-consecuencias que son inaceptables desde el punto de vista de la reproducción celular. Para mantener la integridad de sus genomas, las células han tenido por tanto que desarrollar mecanismos de reparación del ADN dañado. Estos mecanismos de reparación del ADN se pueden dividir en dos clases principales: (1) inversión directa de la reacción química responsable del daño al ADN, y (2) eliminación de las bases dañadas seguida de su reposición con ADN recién sintetizado. Allá donde la reparación del ADN falla, las células han desarrollado mecanismos adicionales que permiten a estas acabar con los daños.

Inversión directa del ADN dañado

La mayoría de los daños producidos en el ADN son reparados mediante la eliminación de las bases dañadas seguida de la síntesis de la región escindida. Algunas lesiones en el ADN, sin embargo, se pueden reparar mediante inversión directa del daño, pudiendo ser un camino más eficiente a la hora de tratar con tipos específicos de daños al ADN que se dan con frecuencia.

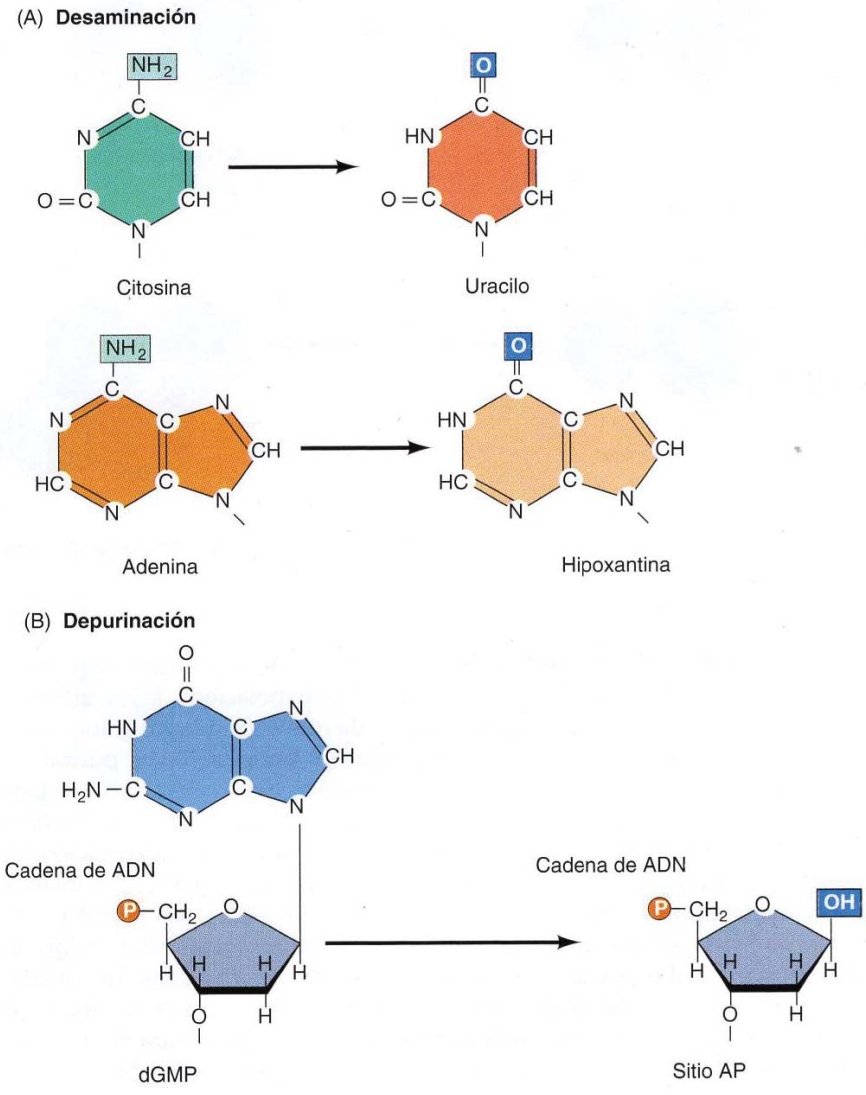


FIGURA 7.17 Daño espontáneo del ADN. Existen dos formas fundamentales de daño espontáneo del ADN: (A) desaminación de adenina, citosina y guanina, y (B) depurinación (pérdida de bases de purina) a causa de la rotura del enlace entre las bases de purina y la desoxirribosa, dejando un sitio apurínico (AP) en el ADN. dGMP = desoxiguanosina monofosfato.

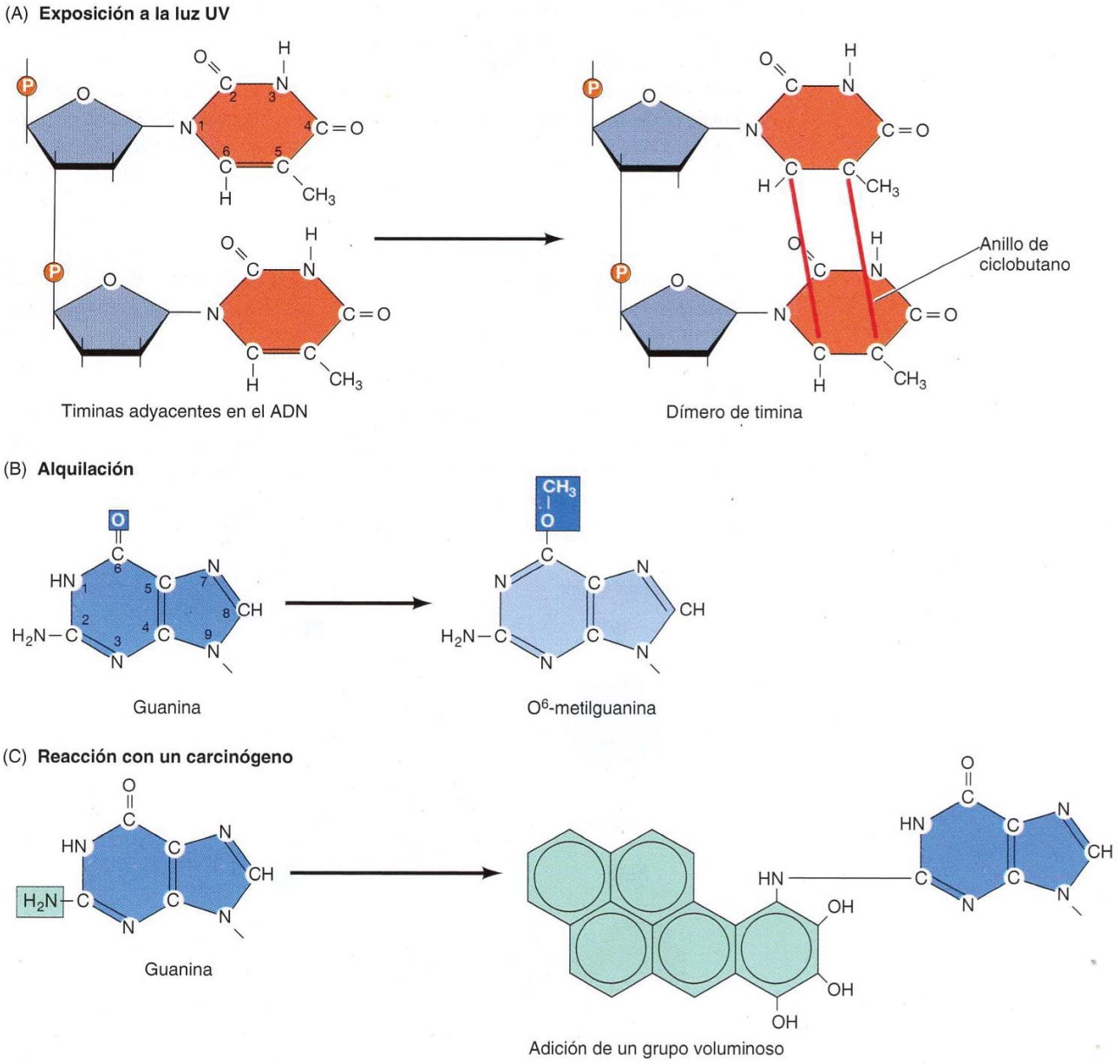


FIGURA 7.18 Ejemplos de daños al ADN inducidos por radiación y agentes químicos. (A) La luz UV induce la formación de dímeros de pirimidina, en los que dos pirimidinas adyacentes (p. ej., timinas) se unen mediante un ciclobutano en estructura de anillo. (B) La alquilación es la adición de grupos metilo o etilo en posiciones diversas en las bases de ADN. En este ejemplo, la alquilación de la guanina en posición O^6 da lugar a la formación de una O^6- metilguanina. (C) Muchos carcinógenos (p. ej., benzo-(α)pireno) reaccionan con las bases del ADN, produciendo la adición de grupos químicos voluminosos a la molécula de ADN.

Tan solo ciertos tipos de daños al ADN se reparan de esta forma, en particular los dímeros de pirimidina que resultan de la exposición a la luz ultravioleta (UV) y los residuos de guanina alquilada que se han modificado por la adición de grupos metilos y etilos en la posición O^6 del anillo de purina.

La luz UV es una de las fuentes más importantes de daño al ADN y también es la forma más estudiada de ADN dañado en términos de mecanismos de reparación. Su importancia se ilustra por el hecho de que la exposición a la radiación solar UV es la causa de la mayoría de los cánceres de piel humanos. El principal tipo de daño inducido por la luz UV es la formación de **dímeros de pirimidina**, en los que las pirimidinas adyacentes en la misma hebra de ADN están unidas por la formación de un anillo de ciclobutano que resulta de la saturación de los dobles enlaces entre el carbono 5 y el 6 (véase Fig. 7.18A). La formación de dichos dímeros distorsiona la estructura de la cadena de ADN y bloquea la transcripción o replicación al pasar por el daño, de ma-

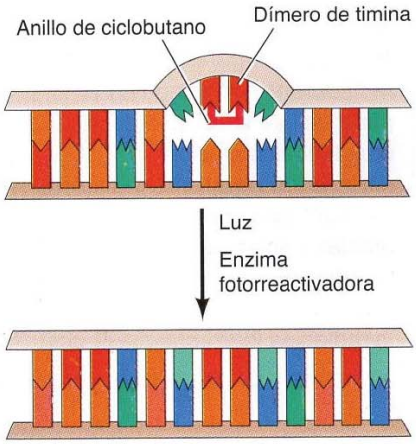


FIGURA 7.19 Reparación directa por fotorreactivación. Los dímeros de timina inducidos por la radiación UV se pueden reparar mediante fotorreactivación, en la que la energía procedente de la luz visible se utiliza para dividir los enlaces formados en el anillo de ciclobutano.

nera que su reparación está relacionada con la capacidad de las células para sobrevivir a la radiación. Uno de los mecanismos de reparación de los dímeros de pirimidina inducidos por UV es la inversión directa de la reacción de dimerización. El proceso se denomina **fotorreactivación** puesto que la energía derivada de la luz visible se utiliza para romper el anillo ciclobutano (**Fig. 7.19**). Las bases originales de pirimidina continúan en el ADN, ahora repuestas a su estado normal. Tal y como se esperaría del hecho de que la radiación solar UV es la fuente principal de daños al ADN en diversos tipos de células, la reparación por fotoactivación de los dímeros de pirimidina es común en una variedad de células procariotas y eucariotas, incluyendo *E. coli*, levaduras y algunas especies de plantas y animales. Curiosamente, sin embargo, la fotorreactivación no es universal; mamíferos placentarios (incluyendo los humanos) carecen de este mecanismo de reparación del ADN.

Otra forma de reparación directa corresponde al daño producido por la reacción entre agentes alquilantes y el ADN. Los agentes alquilantes son compuestos reactivos que son capaces de transferir grupos metilo y etilo a una base de ADN, modificando, por tanto, químicamente la base (véase Fig. 7.18B). Un tipo de daño particularmente importante es la metilación de la guanina en posición O^6, debido a que el producto, O^6-metilguanina, forma pares de bases complementarias con timina en lugar de citosina. Esta lesión puede ser reparada por una enzima (llamada O^6-metilguanina metiltransferasa) que transfiere el grupo metilo desde la O^6-metilguanina al sitio activo de un residuo de cisteína (**Fig. 7.20**). Por tanto, se elimina la modificación química mutagénica potencial, y se restaura la guanina original. Las enzimas que catalizan esta reacción directa de reparación se encuentran en abundancia en procariotas y eucariotas, incluidos los humanos.

Reparación por escisión

Aunque la reparación directa es una manera eficiente de tratar con tipos particulares de daños al ADN, la reparación por escisión abarca la reparación de gran variedad de alteraciones químicas en el ADN. En consecuencia, los diferentes tipos de reparación por escisión son los mecanismos más importantes de reparación del ADN en las células procariotas y eucariotas. En la reparación por escisión, el ADN dañado es reconocido y eliminado, como bases independientes o como nucleótidos. El espacio vacío generado se rellena con la síntesis de una nueva hebra de ADN, utilizando la hebra complementaria no dañada como molde. Los tres tipos de reparación por escisión —reparación

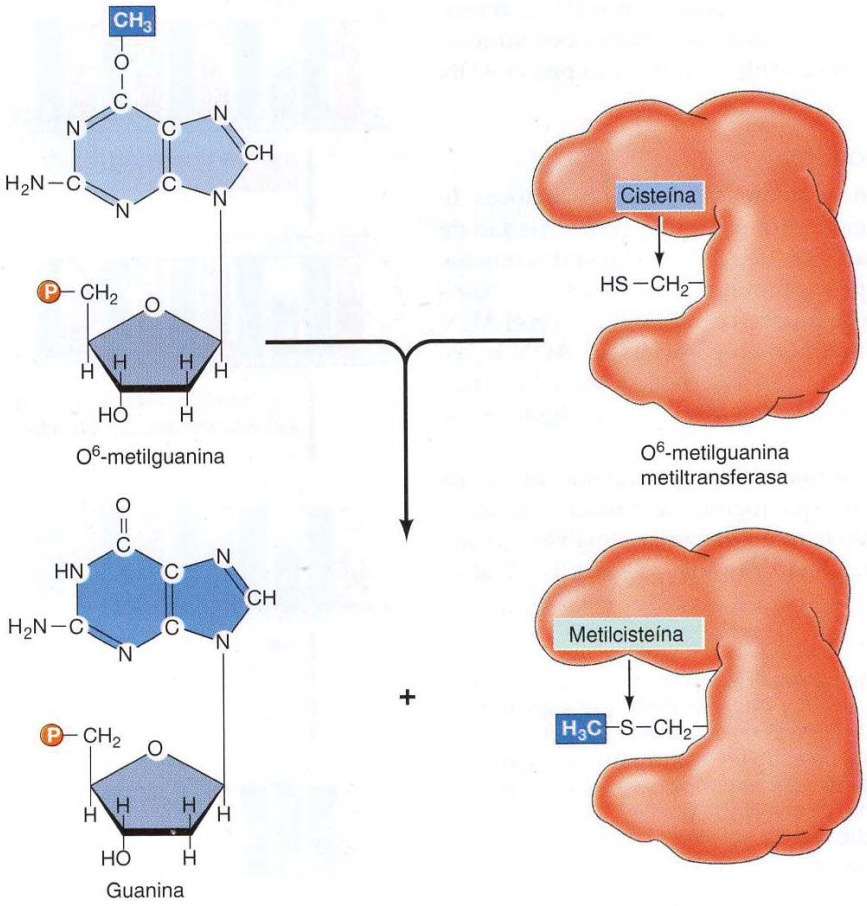


FIGURA 7.20 Reparación de una O^6-metilguanina. Una O^6-metilguanina metiltransferasa transfiere el grupo metilo de la O^6-metilguanina a un residuo de cisteína en el sitio de activación de la enzima.

por escisión de base, reparación por escisión de nucleótido y reparación del desapareamiento— permiten a las células resolver una variedad de tipos diferentes de ADN dañado.

◆ El campeón reparador de ADN: La bacteria *Deinococcus radiodurans* fue aislada en 1956 a partir de latas de carne que se creía que habían sido esterilizadas mediante radiación. Las bacterias sobrevivieron gracias a su extrema resistencia a la radiación. *D. radiodurans* es unas cien veces más resistente a la radiación ionizante que *E. coli.*

Reparación por escisión de bases

La reparación de un ADN que contiene uracilo es un buen ejemplo de la **reparación por escisión de base**, en la que bases dañadas de forma única son reconocidas y eliminadas de la molécula de ADN (**Fig. 7.21**). El uracilo puede surgir en el ADN por dos mecanismos: (1) el uracilo (como dUTP [desoxiuridina trifosfato]) se incorpora ocasionalmente en el lugar de una timina durante la síntesis del ADN, y (2) el uracilo se puede formar en el ADN por la desaminación de una citosina (véase Fig. 7.17A). El segundo mecanismo es de mayor importancia biológica puesto que altera el patrón normal de pares de bases complementarias, lo que representa un acontecimiento mutagénico. La escisión del uracilo en el ADN está catalizada por la **ADN glicosilasa**, una enzima que rompe el enlace de unión de la base de uracilo con el esqueleto de desoxirribosa del ADN. Esta reacción produce un uracilo libre y un sitio apirimidínico —un azúcar sin base—. La ADN glucosilasa también reconoce y elimina otras bases anómalas, incluyendo la hipoxantina formada por la desaminación de adenina, purinas alquiladas distintas que la O^6-alquilguanina, y bases dañadas por oxidación o radiación ionizante.

El resultado de la acción de la ADN glicosilasa es la formación de un sitio apirimidínico o apurínico (generalmente llamado sitio AP) en el ADN. Se forman sitios AP similares como resultado de la pérdida espontánea de bases de purina (véase Fig. 7.17B), que se da en proporciones significativas bajo condiciones celulares normales. Por ejemplo, cada célula en el cuerpo humano se estima que pierde varios miles de bases de purina diariamente. Estos sitios son reparados por la **AP endonucleasa**, que rompe de forma adyacente al sitio AP (véase Fig. 7.21). La desoxirribosa restante por tanto se elimina, y el espacio de una sola base resultante es rellenado por la ADN polimerasa y la ligasa.

Reparación por escisión de nucleótidos

Mientras que la ADN glicosilasa reconoce solamente formas específicas de bases dañadas, otro sistema de reparación reconoce a una gran variedad de bases dañadas que distorsionan a la molécula de ADN, incluyendo dímeros de pirimidina inducidos por UV y grupos voluminosos añadidos a las bases de ADN como resultado de la reacción de muchos carcinógenos con el ADN (véase Fig. 7.18C). Esta forma tan extendida de reparación del ADN se conoce como **reparación por escisión de nucleótidos**, debido a que las bases (p. ej., un dímero de timina) son eliminadas como parte de un oligonucleótido que contiene la lesión (**Fig. 7.22**).

En *E. coli*, la reparación por escisión de nucleótidos está catalizada por los productos de tres genes (*uvrA, uvrB, uvrC*) que fueron identificados debido a que las mutaciones en estos *loci* resultan extremadamente sensibles a la luz UV. La proteína UvrA reconoce al ADN dañado y recluta a UvrB y UvrC al si-

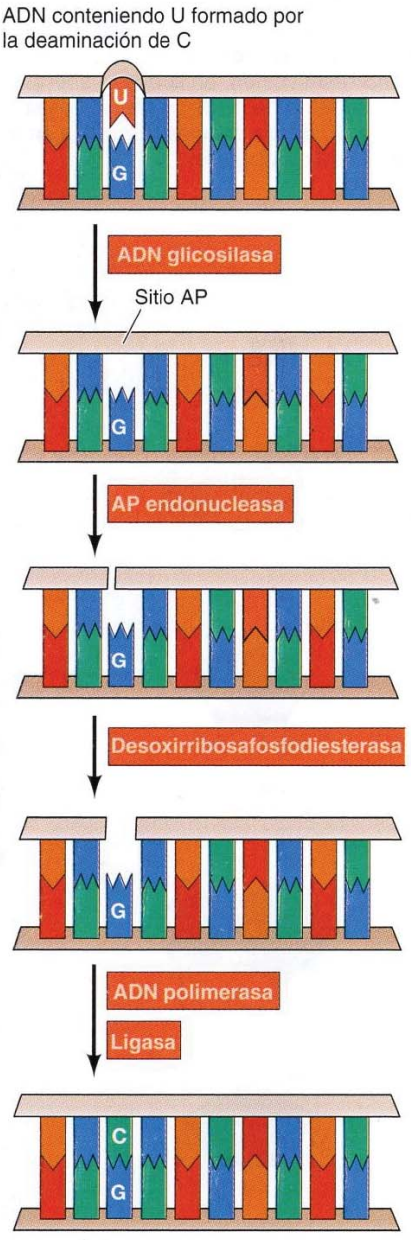


FIGURA 7.21 Reparación por escisión de bases. En este ejemplo, el uracilo (U) se ha formado por desaminación de la citosina (C) y es, por tanto, opuesto a una guanina (G) en la hebra complementaria del ADN. El enlace entre el uracilo y la desoxirribosa lo rompe una ADN glicosilasa, dejando un azúcar sin base unido al ADN (un sitio AP). El sitio es reconocido por una AP endonucleasa, que rompe la cadena de ADN. La desoxirribosa restante es eliminada por la desoxirribosafosfodiesterasa. El espacio que resulta lo rellena la ADN polimerasa y lo une una ligasa, conduciendo a la incorporación de la base correcta (C) opuesta a G.

tio de la lesión. UvrB y UvrC entonces rompen los extremos 3′ y 5′ del sitio dañado, respectivamente, y por tanto escinden un oligonucleótido que consiste en 12 o 13 bases. El complejo UvrABC con frecuencia se denomina **escinucleasa**, un nombre que refleja su capacidad para *escindir* un oligonucleótido. Posteriormente se requiere la acción de una helicasa para eliminar al oligonucleótido que contiene el daño de la molécula de ADN de doble hélice, y el espacio resultante será rellenado por la ADN polimerasa I y unido por la ligasa.

Los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos se han estudiado extensamente en eucariotas, en particular en levaduras y en humanos. En levaduras, como ocurre en *E. coli*, se han identificado diversos genes implicados en la reparación del ADN (llamados genes *RAD* por sensibles a la *ra*diación) mediante el aislamiento de mutantes con sensibilidad aumentada a la luz UV. En humanos, los genes de la reparación del ADN se han identificado mediante el estudio de individuos que sufren de enfermedades hereditarias que resultan de las deficiencias en la capacidad de reparar el ADN dañado. De estas enfermedades la más estudiada es el xeroderma pigmentosum (XP), un desorden genético raro que afecta aproximadamente a uno de cada 250.000 individuos. Los individuos con esta enfermedad son extremadamente sensibles a la luz UV y desarrollan múltiples cánceres de piel

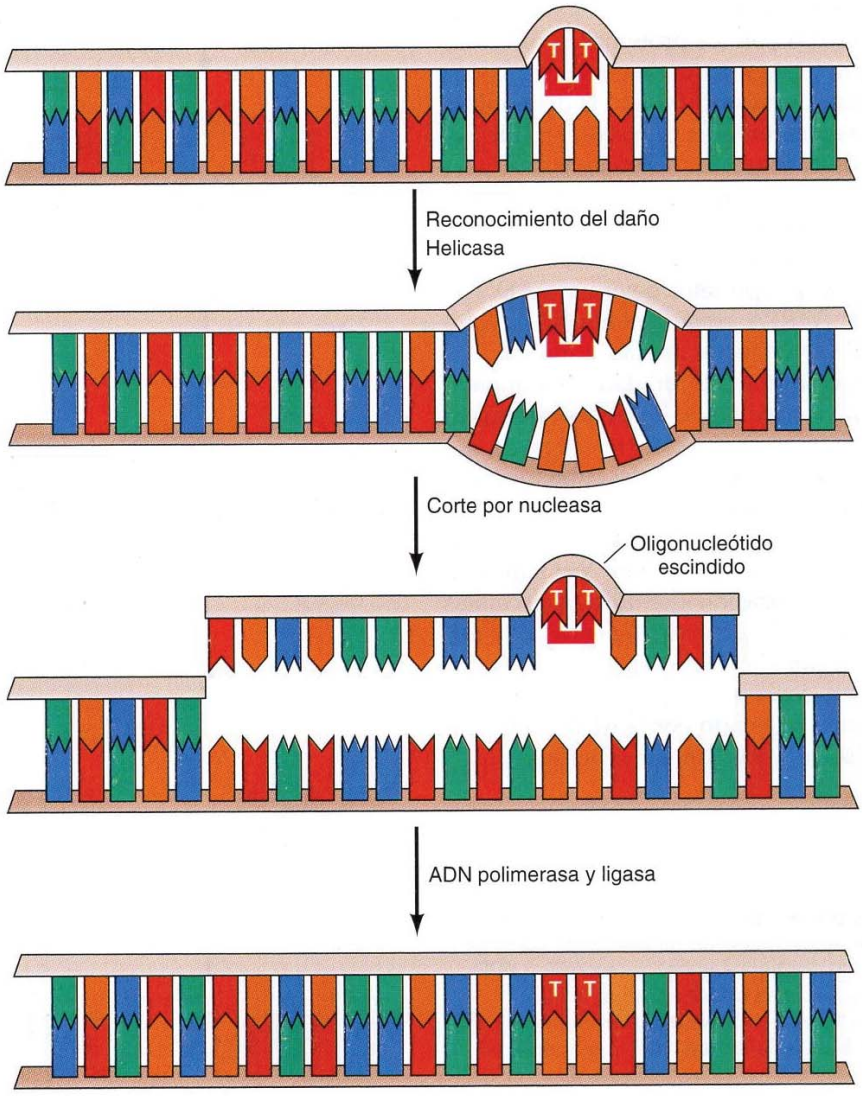


FIGURA 7.22 Reparación por escisión de nucleótidos de los dímeros de timina. El ADN dañado es reconocido y después se desenrolla alrededor del lugar de la lesión mediante una helicasa. A continuación, el ADN se escinde en los dos lados de un dímero de timina por la acción de las nucleasas 3' y 5' produciendo la escisión de un oligonucleótido que contiene las bases dañadas. El espacio resultante lo rellena la ADN polimerasa y lo une una ligasa.

en las regiones del cuerpo que están expuestas a la luz solar. En 1968 James Cleaver hizo el descubrimiento clave de que las células en cultivo de pacientes con XP tenían deficiencias en llevar a cabo el sistema de reparación por escisión de nucleótidos. Esta observación no solo proporcionó la primera conexión entre la reparación del ADN y el cáncer, sino que sugirió el uso de células XP como sistema experimental para identificar a los genes humanos reparadores del ADN. La identificación de los genes humanos reparadores del ADN se ha llevado a cabo mediante estudios no solo con células XP, sino con otras dos enfermedades humanas que resultan de defectos en la reparación del ADN (síndrome de Cockayne y tricotiodistrofia) y con mutantes sensibles a UV procedentes de líneas celulares de roedores. La disponibilidad de células de los mamíferos con defectos en la reparación del ADN ha permitido la clonación de genes reparadores basada en la capacidad de los alelos de tipo salvaje de restaurar la sensibilidad normal al UV en las células mutantes mediante ensayos de transferencia de genes, dejando una puerta abierta a los análisis experimentales de reparación por escisión de nucleótidos en las células de los mamíferos.

La clonación molecular hasta ahora ha identificado siete genes de reparación diferentes (designados desde *XPA* hasta *XPG*) que mutados en los casos de xeroderma pigmentosum, como en algunos casos de síndrome de Cockayne, tricotiodistrofia, y mutantes sensibles a la radiación UV de células de roedores. Las proteínas codificadas por estos genes de reparación del ADN de mamíferos están muy relacionadas con las proteínas codificadas por los genes *RAD* de levaduras, lo que indica que la reparación por escisión de nucleótidos está muy conservada entre los eucariotas. Con la disponibilidad de genes de reparación de levaduras y mamíferos clonados, ha sido posible purificar las proteínas que codifican y desarrollar sistemas *in vitro* para estudiar sus papeles en el proceso de reparación (**Fig. 7.23**). El paso inicial de la reparación por escisión en las células de mamífero implica el reconocimiento de alteraciones del emparejamiento de bases por parte de XPC, seguida de la unión cooperativa de XPA, XPC y la proteína de unión a ADN de hebra sencilla, la proteína de replicación A (RPA: *replication protein* A) estudiada antes en este capítulo (véase Fig. 7.8) y un factor de transcripción. XPC está asociada con un factor de transcripción multisubunidad denominado TFIIH, que es necesario para iniciar la transcripción de los genes eucariotas (véase Cap. 8). En algunos casos, XPE puede intervenir también en el reconocimiento de lesiones. Dos de las subunidades de TFIIH son las proteínas XPB y XPD, que actúan como helicasas para desenrollar aproximadamente 25 pares de bases de ADN en torno a la zona de lesión. La proteína XPG es entonces reclutada al complejo, seguido del reclutamiento de XPF formando un heterodímero con ERCC1 (una proteína de reparación identificada en células de roedor sensibles al UV). XPF1/ERCC1 y XPG son endonucleasas, que cortan el ADN en los extremos 5′ y 3′ de la región dañada, respectivamente. Estos cortes escinden un oligonucleótido que consiste en aproximadamente 30 bases. El hueco resultante es a continuación rellenado por la ADN polimerasa δ (en asociación con RFC y PCNA) y sellado mediante una ligasa.

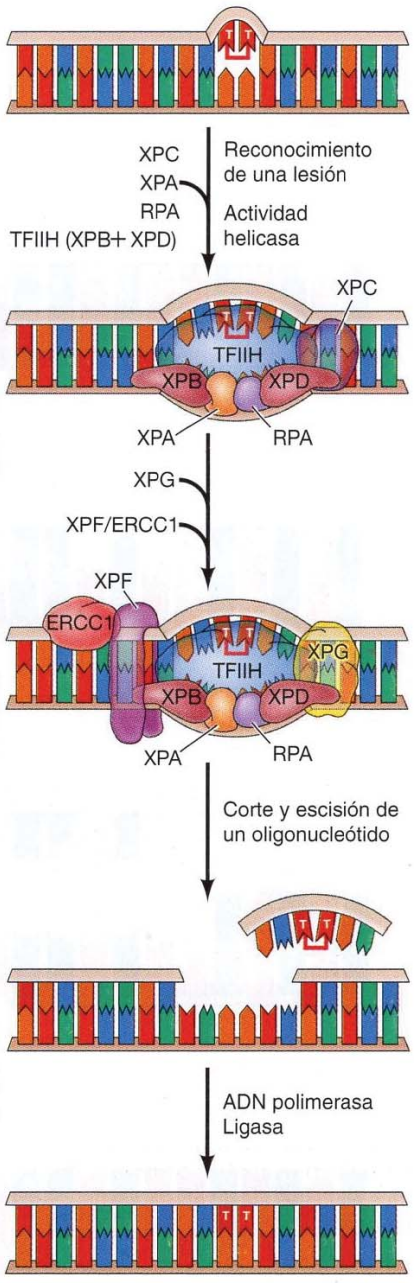


FIGURA 7.23 Reparación mediante escisión de nucleótidos en células de mamífero. XPC reconoce las lesiones en el ADN (como un dímero de timidina), lo que induce la unión de XPA, RPA y TFIIH, que contiene las helicasas XPB y XPD. Tras el desenrollamiento del ADN por XPB y XPD, las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 se incorporan al complejo para llevar a cabo la escisión del ADN con eliminación del oligonucleótido dañado. La ADN polimerasa rellena el hueco así creado que será sellado por una ligasa.

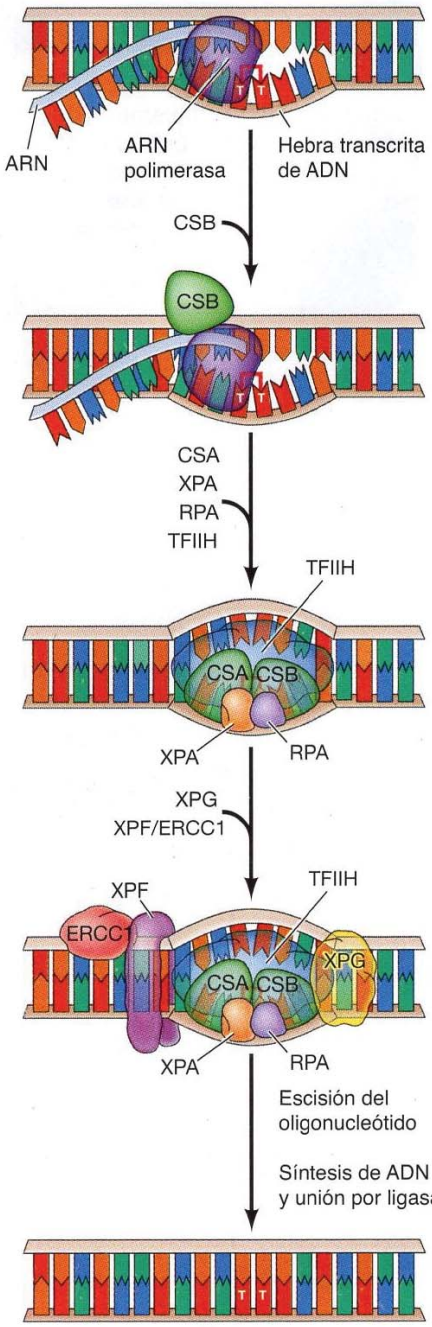


FIGURA 7.24 Reparación acoplada a la transcripción en células de mamífero. La ARN polimerasa se detiene debido a la presencia de una lesión (p. ej., un dímero de timidina) en la hebra transcrita del ADN. La polimerasa obstruida es reconocida por CSB en el lugar de la lesión. Después, la CSB recluta CSA, XPA, RPA y TFIIH, y la reparación de la escisión prosigue tal como se describe en la Figura 7.23.

Reparación acoplada a la transcripción

A pesar de que el ADN dañado puede reconocerse a lo largo del genoma, una alternativa a la reparación por escisión de nucleótidos, denominada **reparación acoplada a la transcripción**, está dedicada específicamente a la reparación de lesiones en genes que son transcritos activamente (**Fig. 7.24**). Una conexión entre la transcripción y la reparación fue sugerida por primera vez por experimentos que mostraban que las hebras de ADN transcrito son reparadas más rápidamente que las hebras no transcritas tanto en *E. coli* como en células de mamífero. Puesto que las lesiones del ADN bloquean la transcripción, este acoplamiento de la reparación a la transcripción se cree ventajoso, permitiendo a la célula reparar preferentemente las lesiones de los genes que se expresan activamente. Tanto en *E. coli* como en células de mamífero, el mecanismo de acoplamiento de la reparación a la transcripción implica el reconocimiento de la ARN polimerasa detenida en una lesión de la hebra de ADN que se está transcribiendo. En *E. coli*, la ARN polimerasa detenida es reconocida por una proteína denominada factor de acoplamiento de la reparación a la transcripción, que desplaza a la ARN polimerasa y recluta a la escinucleasa UvrABC a la zona de la lesión. En las células de mamífero, la reparación acoplada a la transcripción implica el reconocimiento de la ARN polimerasa por parte de dos proteínas (CSA y CSB) que están codificadas por los genes responsables del síndrome de Cockayne. Al contrario que en pacientes con xeroderma pigmentoso, los pacientes con el síndrome de Cockayne son deficientes específicamente en la reparación acoplada a la transcripción, lo que es consistente con el papel de CSA y CSB como factores acopladores de la reparación a la transcripción. Tras el reconocimiento de la polimerasa de ARN detenida, las proteínas CSA y CSB reclutan a XPA, RPA y TFIIH hacia la lesión del ADN y se produce una reparación por escisión de nucleótidos del modo descrito en la Figura 7.23.

Reparación no complementaria

Otro sistema de reparación por escisión de reparación reconoce a las bases no complementarias que se incorporan durante la replicación del ADN. Muchas de estas bases no complementarias se eliminan por la actividad de la doble lectura de la ADN polimerasa. Las que se pierden son el objetivo de una corrección posterior por parte del sistema de **reparación no complementaria**, que barre de nuevo al ADN replicado. Si se encuentra una no-complementariedad, las enzimas de este sistema de reparación son capaces de identificar y escindir la base no complementaria específicamente de la hebra de ADN recién replicada, permitiendo que se corrija el error y la secuencia original sea reemplazada.

En *E. coli*, la capacidad del sistema de reparación no complementaria para distinguir la hebra de ADN parental de la hebra de ADN recién sintetizada se basa en el hecho de que el ADN de esta bacteria se modifica por la metilación de los residuos de adenina en la secuencia GATC para formar 6-metiladenina (**Fig. 7.25**). Puesto que la metilación ocurre después de la replicación, las hebras de ADN recién sintetizadas no están metiladas y pueden ser reconocidas específicamente por las enzimas del sistema de reparación no complementaria. La reparación no complementaria se inicia con la proteína MutS, que reconoce la no-complementariedad y forma un complejo con otras dos proteínas llamadas MutL y MutH. La endonucleasa MutH rompe la hebra de ADN sin metilar en la secuencia GATC. MutL y MutS actúan después juntas con una exonucleasa y una helicasa para escindir el ADN entre la «brecha» de la hebra y la no-complementariedad, dejando un espacio que lo rellenarán la ADN polimerasa y la ligasa.

Los eucariotas tienen un sistema de reparación no complementaria similar, aunque el mecanismo por el que las células eucariotas identifican al

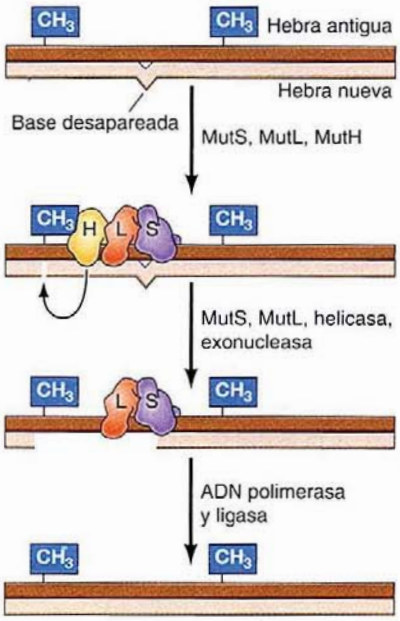


FIGURA 7.25 Reparación de apareamientos en *E. coli*. El sistema de reparación de apareamientos detecta y escinde las bases desapareadas en el ADN recién replicado, que se diferencia de la hebra parental debido a que todavía no ha sido metilada. MutS se une a la base desapareada, seguido de MutL. La unión a MutL activa a MutH, que rompe a la hebra no modificada opuesta al sitio de la metilación. MutS y MutL, junto con una helicasa y una exonucleasa, escinden la porción de la hebra no modificada que contiene el desapareamiento. La ADN polimerasa rellena el espacio que finalmente queda unido por la ligasa.

VÍDEO 7.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v7.2

Reparación no complementaria dirigida por metilo. En *E. coli*, la reparación no complementaria se ve facilitada por la ausencia de metilación en las hebras de ADN recién sintetizadas.

ADN recién sintetizado es distinto al usado por *E. coli*. En las células de los mamíferos, parece ser que la especificidad de la hebra para la reparación no complementaria no está determinada por la metilación del ADN. En su lugar, la presencia de roturas en una sola hebra en ADN recién replicado parece especificar la hebra a reparar. Los homólogos eucariotas de MutS y MutL (MSH y MLH, respectivamente) se unen a la base no apareada, al igual que en *E. coli* y dirigen la escisión del ADN que se encuentra entre la rotura de la hebra y apareamiento erróneo (**Fig. 7.26**). La nueva hebra tardía recién sintetizada puede identificarse por la presencia de roturas en ambos extremos de los fragmentos de Okazaki, mientras que la hebra conductora se puede identificar por su extremo 3′ en crecimiento.

La importancia de este sistema de reparación se verifica dramáticamente por el hecho de que mutaciones en MSH y MLH son responsables de un tipo de cáncer de colon hereditario (cáncer colorrectal hereditario no poliposo, o HNPCC). HNPCC es una de las enfermedades hereditarias más comunes; afecta a uno de cada 200 individuos y es responsable del 15% de todos los cánceres colorrectales en Estados Unidos. La relación entre el HNPCC y los defectos de la reparación no complementaria se descubrió en 1993, cuando dos grupos de investigación clonaron al homólogo humano de *MutS* (MSH) y encontraron que las mutaciones en este gen eran las responsables de casi la mitad de todos los casos de HNPCC. Estudios posteriores han demostrado que la mayoría de los casos restantes de HNPCC están causados por mutaciones en uno de los tres

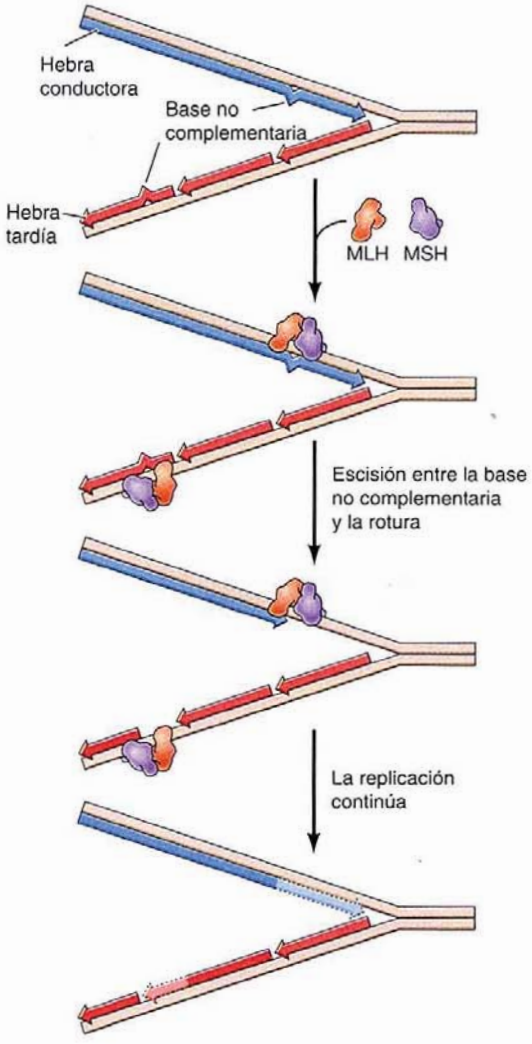
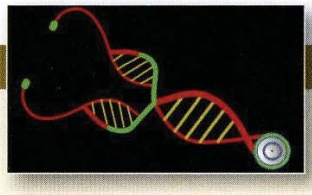


FIGURA 7.26 Reparación no complementaria en células de mamífero. Las proteínas eucarióticas homólogas de MutS y MutL (MSH y MLH, respectivamente) se unen a una base no complementaria y dirigen la escisión del fragmento de ADN comprendido entre dicha base y una rotura en la hebra del ADN. Existen roturas en la hebra tardía recién sintetizada en ambos extremos de los fragmentos de Okazaki, así como en el extremo 3′ en crecimiento de la hebra conductora.



MEDICINA MOLECULAR

Cáncer de colon y reparación del ADN

Enfermedad

Los cánceres de colon y recto (cánceres colorrectales) son uno de los tipos de cánceres más comunes en los países industrializados, contando con cerca de 150.000 casos de cáncer cada año en Estados Unidos (aproximadamente un 10% de la incidencia total del cáncer). La mayoría de los cánceres de colon (al igual que otros tipos de cáncer) no son enfermedades hereditarias; es decir, que no se transmiten directamente de padres a hijos. Sin embargo, se han descrito dos formas hereditarias de cáncer de colon. En estos dos síndromes, la herencia de un gen susceptible al cáncer presenta un potencial muy alto de desarrollar cáncer. Una de las formas heredadas de cáncer de colon (poliposis adenomatosa familiar) es extremadamente rara, representando menos del 1% de la incidencia total del cáncer de colon. La segunda forma heredada del cáncer de colon (cáncer colorrectal hereditario no poliposo, o HNPCC) es más común y representa alrededor del 15% de todos los casos cáncer de colon. Además, el HNPCC es una de las enfermedades hereditarias más comunes, afectando a una de cada 200 personas. Aunque los cánceres de colon son la manifestación más clara de esta enfermedad, los individuos afectados también sufren un incremento de la incidencia de otros tipos de cáncer, como son el cáncer de ovario y endometrio.

Bases moleculares y celulares

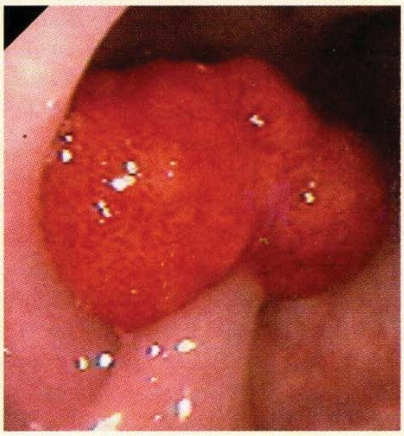
Igual que otros cánceres, el cáncer colorrectal es el resultado de mutaciones producidas en genes que regulan la proliferación celular, conduciendo al crecimiento incontrolado de las células cancerígenas. En la mayoría de los casos estas mutaciones ocurren de forma esporádica en las células somáticas. En los cánceres hereditarios, sin embargo, las mutaciones de la línea germinal predisponen al individuo a desarrollar el cáncer.

En 1993 se produjo un avance extraordinario con el descubrimiento de que un gen responsable de aproximadamente el 50% de los casos de HNPCC codificaba a una enzima implicada en la reparación de los apareamientos en el ADN; este gen es un homólogo humano del gen de *E. coli MutS*. Estudios posteriores han demostrado que otros tres genes, responsables de la mayoría de los casos restantes de HNPCC, son homólogos de *MutL* y que, por tanto, están implicados en el proceso de reparación de apareamientos. Los defectos en estos genes parecen corresponderse con una alta frecuencia de mutaciones en otros genes celulares, y a su vez con una alta probabilidad de que algunas de estas mutaciones conduzcan eventualmente al desarrollo del cáncer por afectar a genes que regulan la proliferación celular.

Prevención y tratamiento

De manera similar a otras enfermedades hereditarias, la identificación de los genes responsables de HNPCC permite que los individuos con riesgo de heredar el cáncer sean identificados a través de una prueba genética. Además, el diagnóstico genético prenatal podría ser de vital importancia para los portadores de mutaciones HNPCC que planean tener descendencia. No obstante, los beneficios potenciales de la detección de estas mutaciones no se limitan a prevenir la transmisión de genes mutantes a la siguiente generación; su detección también puede ayudar a prevenir el desarrollo del cáncer en individuos afectados.

En términos de prevención de la enfermedad, una de las características claves del cáncer de colon es su desarrollo gradual durante varios años. El diagnóstico temprano de la enfermedad mejora sustancialmente



Un pólipo del colon visualizado por colonoscopia.

las posibilidades de supervivencia del paciente. La fase inicial de desarrollo del cáncer de colon es el crecimiento de pequeños pólipos benignos, que con el tiempo se transformarán en malignos e invadirán el tejido conectivo de su alrededor. Anterior al desarrollo de la malignidad, sin embargo, los pólipos se pueden eliminar quirúrgicamente con facilidad, previniendo de forma eficaz el crecimiento de un tumor maligno. Los pólipos y las primeras fases del cáncer de colon se pueden detectar a través del examen del colon con un tubo delgado iluminado (colonoscopia), de manera que la colonoscopia frecuente en pacientes con HNPCC podría permitir la eliminación de los pólipos antes de que el cáncer se desarrolle. Además, diversos medicamentos se han estado probando como inhibidores potenciales del desarrollo del cáncer de colon, pudiendo resultar un gran beneficio para los pacientes con HNPCC. Permitiendo la aplicación controlada de tales medidas preventivas, la identificación de mutaciones responsables de HNPCC podría contribuir de manera significante a la prevención de la enfermedad.

genes humanos que son homólogos a *MutL* (MLH). Defectos en estos genes parecen resultar en una elevada frecuencia de mutaciones en otros genes celulares, con una elevada probabilidad correspondiente de que alguna de estas mutaciones finalmente desencadene el desarrollo de cáncer.

Síntesis de ADN translesión

Los sistemas de reversión directa y la reparación por escisión actúan para corregir daños del ADN antes de la replicación, para que la síntesis de ADN replicativo pueda proceder empleando una hebra de ADN no dañada como molde. Si estos sistemas fallasen, sin embargo, la célula posee mecanismos alternativos para tratar el ADN dañado en la horquilla de replicación. Los dímeros de pirimidina y muchos otros tipos de lesiones no pueden copiarse por la acción normal de las ADN polimerasas, así que la replicación se bloquea en puntos con dichas lesiones. Sin embargo, las células también poseen varias ADN polimerasas especializadas capaces de replicar a través de un punto de ADN dañado. La replicación del ADN dañado por estas polimerasas especializadas, denominadas **síntesis de ADN translesión**, proporciona un mecanismo por el que la célula puede cuentear la lesión del ADN en el horquilla de replicación, que puede ser corregido tras completar la replicación.

La primera ADN polimerasa especializada responsable de síntesis de ADN translesión fue descubierta en *E. coli* en 1999. Esta enzima, denominada polimerasa V, es inducida en respuesta a una extensa irradiación UV y puede sintetizar una nueva hebra de ADN opuesta a un dímero de timina (**Fig. 7.27**). Otras dos ADN polimerasas de *E. coli*, las polimerasas II y IV, se inducen de forma similar por el ADN lesionado y funcionan en síntesis translesión. Las células eucarióticas también contienen múltiples ADN polimerasas especializadas, y se han descrito, al menos, cinco enzimas que intervienen en la síntesis translesión en las células de mamífero. Estas polimerasas especializadas sustituyen a la polimerasa normal que ha quedado detenida ante una lesión del ADN. Son capaces de hacer proseguir la síntesis en el lugar de la lesión, después de lo cual serán sustituidas de nuevo por la polimerasa replicativa normal.

Todas las ADN polimerasas especializadas muestran una baja fidelidad cuando copian ADN no dañado y carecen de la actividad correctora 3′ → 5′ (véase Fig. 7.11), por lo que sus tasas de error son entre 100 y 10.000 veces mayores que las tasas de error de las ADN polimerasas replicativas normales (como la polimerasa III en *E. coli* o las polimerasas δ y ε en células eucarióticas). No obstante, poseen una cierta selectividad en la inserción de la base correcta en la posición opuesta a algunos tipos de lesiones del ADN, aunque tienden a cometer errores al insertar bases en la posición opuesta a otras variantes de daños o al sintetizar ADN a partir de un molde normal sin lesiones.

Reparación de roturas de doble hebra

Las **roturas de doble hebra** representan una variante especialmente peligrosa de daños del ADN, ya que la presencia de roturas en ambas hebras del ADN interrumpe la continuidad de dicha molécula. Estas roturas bicatenarias se producen de manera natural en el transcurso de la replicación del ADN, por ejemplo, cuando la ADN polimerasa se topa con una rotura en la hebra molde de ADN en la horquilla de replicación. Por otra parte, la radiación ionizante (como los rayos X) y algunos compuestos químicos que dañan el ADN a través de la creación de roturas en ambas hebras pueden producir roturas de doble hebra.

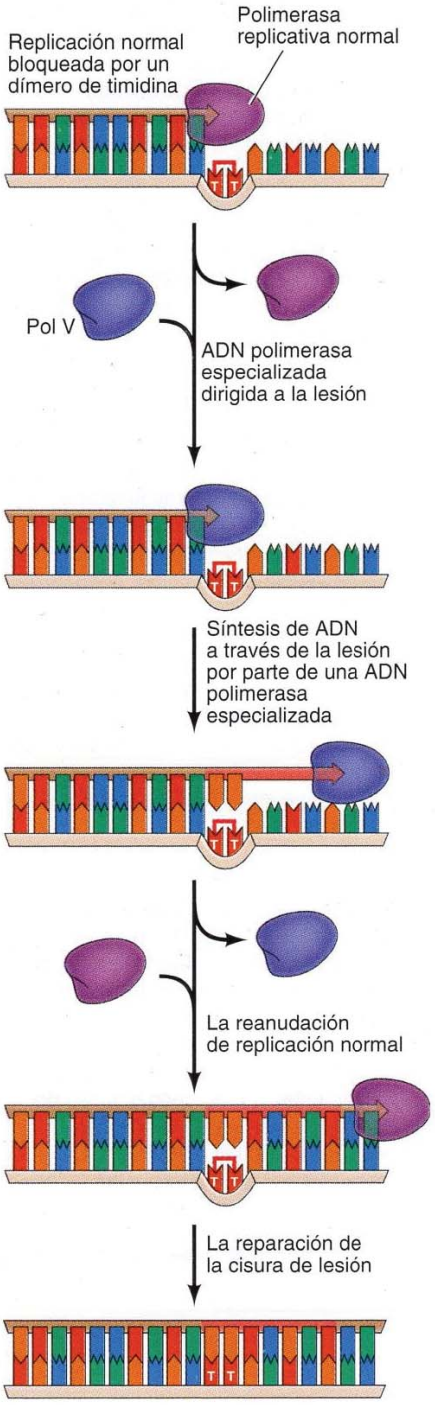


FIGURA 7.27 Síntesis de ADN translesión. La replicación normal es bloqueada por un dímero de timina, pero las ADN polimerasas especializadas como la polimerasa V (pol V) reconocen y continúan la síntesis de ADN a lo largo de la lesión. Es posible entonces reanudar la replicación mediante la ADN polimerasa replicativa normal y el dímero de timidina eliminado posteriormente por reparación de escisión de nucleótidos (véase Fig. 7.22).

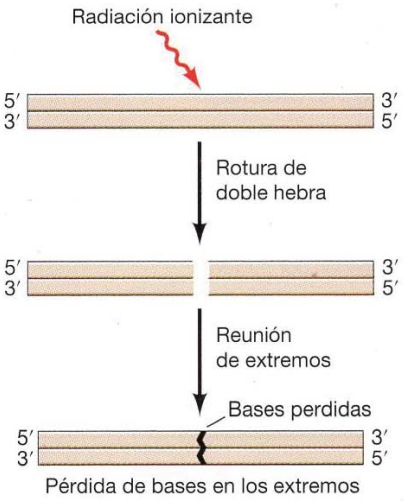


FIGURA 7.28 Reparación de roturas de doble hebra. La radiación ionizante y algunos agentes químicos inducen roturas de doble hebra en el ADN. Estas roturas pueden ser reparadas. Estas roturas pueden ser reparadas reuniendo los extremos de la molécula rota, lo que con frecuencia da lugar a una pérdida de bases en torno al punto dañado.

Las roturas bicatenarias afectan a ambas hebras del ADN, por lo que no son susceptibles de reparación mediante mecanismos basados en la síntesis de ADN en el fragmento dañado. Por ello, la reparación de las roturas de doble hebra tiene lugar a través de un mecanismo especial, la **reparación recombinatoria**. En el ejemplo más simple, las roturas de hebra doble pueden repararse simplemente volviendo a unir los extremos rotos de una sola molécula de ADN (**Fig. 7.28**). No obstante, esto da lugar a una elevada frecuencia de errores secundarios a la deleción de bases en las proximidades de la zona alterada.

Otra posibilidad es que las roturas bicatenarias se reparen mediante **recombinación homóloga** con secuencias de ADN de un cromosoma ileso, lo que constituye un mecanismo para reparar esas alteraciones y restaurar la secuencia normal de ADN (**Fig. 7.29**). En las células eucariotas, este mecanismo de reparación solo está operativo después de la replicación del ADN, cuando las cromátidas hermanas recién replicadas siguen estando unidas (véase Fig. 6.23). La recombinación homóloga resulta de la rotura y nueva unión de dos moléculas de ADN parentales, que da lugar a la reordenación de la información genética de los dos cromosomas parentales. El proceso se inicia en las roturas de hebra doble, durante la reparación del ADN y en la recombinación entre cromosomas homólogos de la meiosis (descrita en el capítulo 17). En las roturas bicatenarias, ambas hebras de ADN son escindidas en primer lugar por nucleasas que digieren ADN en la dirección 5′→ 3′, produciendo extremos 3′ monocatenarios colgantes. Estas hebras únicas invaden entonces la otra molécula parental mediante el emparejamiento de bases homólogas. A continuación, los huecos se rellenan por síntesis reparadora y las hebras se ligan para producir una molécula recombinante.

La proteína clave de la recombinación homóloga es **RecA** en *E. coli* y **Rad51** en las células eucariotas. Estas proteínas se unen al ADN monocatenario, formando filamentos proteína-ADN (**Fig. 7.30**). A continuación, se unen a una segunda molécula de ADN bicatenario, formando un complejo entre los dos ADN, y catalizan el intercambio de hebras entre secuencias homólogas. Hay que destacar que uno de los genes responsables del cáncer de mama hereditario *(BRCA2)* codifica una proteína que recluta Rad51 hacia el ADN monocatenario generado en las roturas de hebra doble, lo que indica que las alteraciones en este tipo de reparación del ADN pueden dar lugar al desarrollo de uno de los cánceres más frecuente en las mujeres.

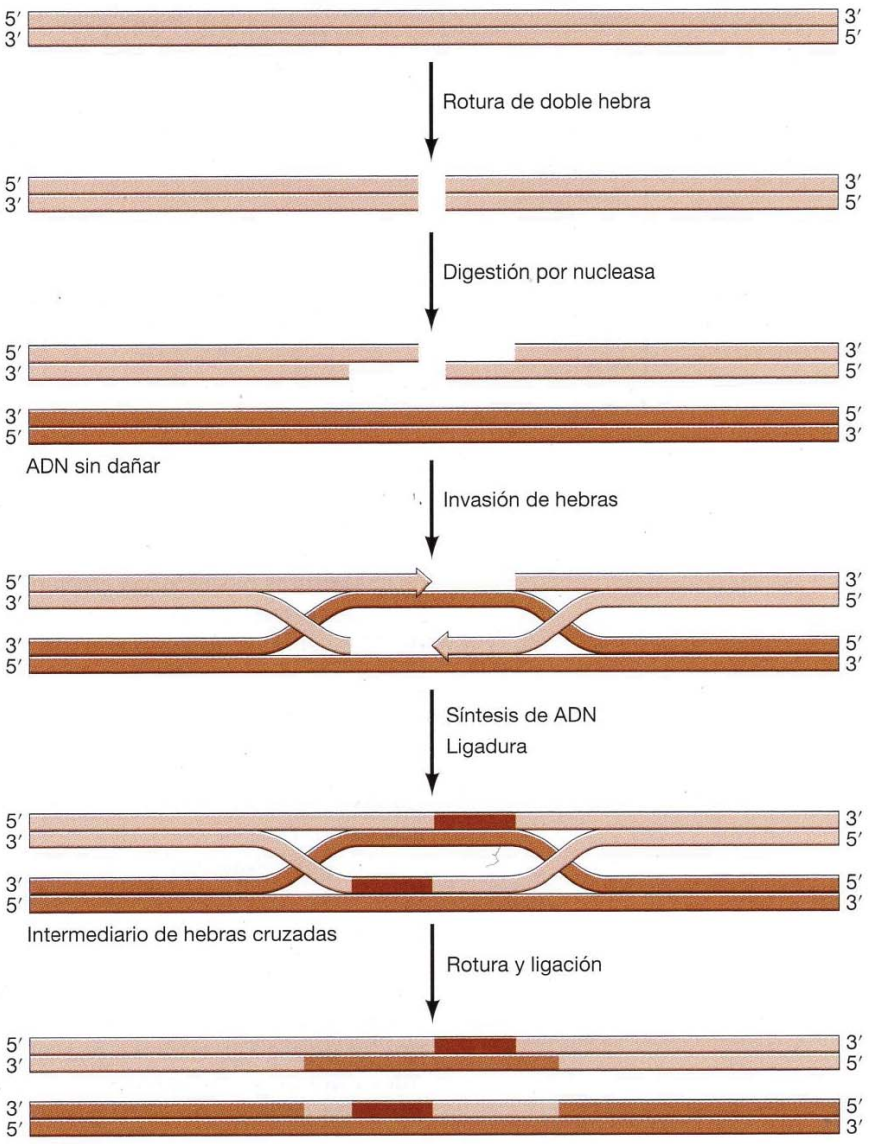


FIGURA 7.29 Reparación de roturas de doble hebra mediante recombinación homóloga. Las roturas de doble hebra pueden repararse mediante recombinación homóloga con un cromosoma ileso, restaurando la secuencia normal de ADN. Ambas hebras de ADN son digeridas por nucleasas en el punto de rotura de doble hebra en la dirección 5′ a 3′. Los extremos 3′ colgantes invaden entonces la otra molécula parental mediante el emparejamiento de bases homólogas. A continuación, los huecos se rellenan por síntesis reparadora y se sellan por ligación, produciendo un intermediario de hebras cruzadas. La división y ligadura de las hebras cruzadas dan lugar entonces a moléculas recombinantes.

Reorganización del ADN

La recombinación entre cromosomas homólogos, ya sea durante la meiosis o en la reparación de ADN, da lugar a la reorganización de genes entre pares de cromosomas sin alterar la disposición de los genes en el genoma. Por el contrario, otros procesos recombinatorios conducen a la reorganización del ADN genómico. Algunas de estas organizaciones del ADN son importantes para el control de la expresión génica en determinados tipos de células; otros pueden desempeñar un papel evolutivo al contribuir con la diversidad genética.

El descubrimiento de que los genes son capaces de moverse a diferentes localizaciones surgió a raíz de los estudios de Barbara McClintock con maíz en los años cuarenta. Basada estrictamente en análisis genéticos, McClintock describió nuevos elementos genéticos que podían moverse a distintas localizaciones en el genoma y que alteraban la expresión de los genes adyacentes. Sin embargo, tuvieron que pasar cerca de tres décadas después del

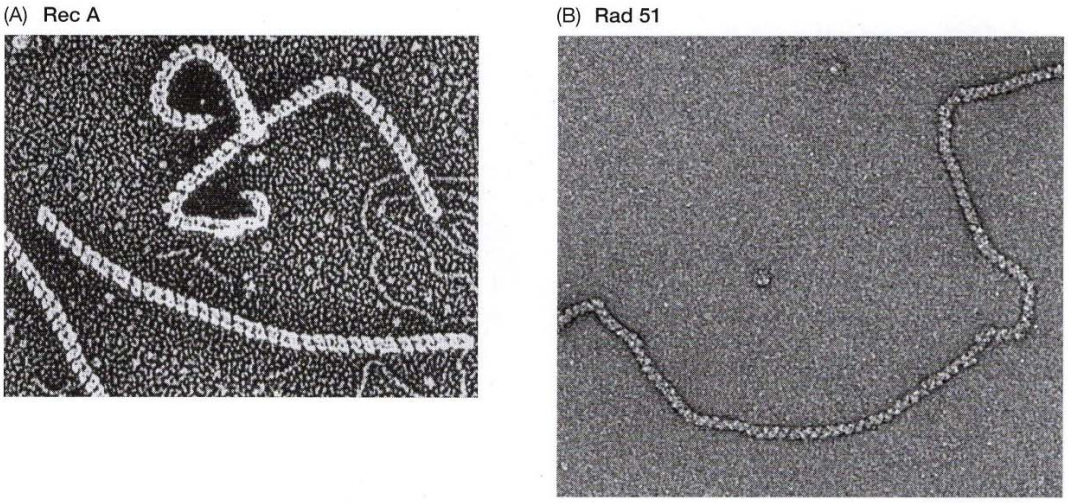


FIGURA 7.30 Filamentos de proteína ADN de RecA y Rad51. Micrografías electrónicas de filamentos formados por la unión de las proteínas RecA de *E. coli* (A) y Rad51 de humanos al ADN (B). (Cortesía de A. Stasiak y S. West.)

descubrimiento de McClintock hasta que la mayoría de los científicos aceptaran el descubrimiento de elementos transposables en bacterias y la noción de elementos genéticos móviles. Actualmente se reconocen diversos tipos de reorganizaciones del ADN, incluyendo la transposición de los elementos inicialmente descrita por McClintock, en las células procariotas y eucariotas. Es más, en la actualidad se sabe que los elementos transponibles constituyen una gran fracción de los genomas de animales y plantas, incluyendo casi la mitad del genoma humano (véase Tabla 6.3).

Como se vio en el Capítulo 6, los elementos susceptibles de transposición pueden moverse a nuevos puntos aleatorios en el ADN cromosómico y han desempeñado un papel importante en la evolución de nuestro genoma. Sin embargo, en general no presentan una función útil para las células en las que tiene lugar la transposición. En cambio, las reordenaciones del ADN programadas, que se analizan más adelante, pueden desempeñar una función importante en el desarrollo y la regulación de la expresión génica.

Tipos de apareamiento en levaduras

El control del tipo de apareamiento de levaduras proporciona un ejemplo bien estudiado de una reordenación de ADN programada mediada por la recombinación homóloga entre secuencias específicas (**recombinación específica del sitio**). *S. cerevisiae* puede replicarse por mitosis como células haploides o diploides (**Fig. 7.31**). El estado diploide confiere ventajas en condiciones de estrés, como la falta de disponibilidad de nutrientes, dado que las células diploides pueden experimentar meiosis y formar cuatro esporas haploides, capaces a su vez de germinar cuando mejoren las condiciones. Los diploides pueden producirse por el apareamiento de dos células haploides de diferentes tipos de apareamiento, designadas como *MAT*a o *MAT*α, dependiendo del alelo del locus de tipo de apareamiento (MAT) que se exprese. De forma importante, las levaduras haploides son capaces de cambiar entre los tipos de apareamiento *MAT*a y *MAT*α, lo que permite que las células obtenidas de una única colonia generen una población mixta de levaduras *MAT*a y *MAT*α capaces de formar diploides.

La base molecular del cambio de tipo de apareamiento implica una recombinación específica del sitio entre tres loci de tipo de apareamiento en el

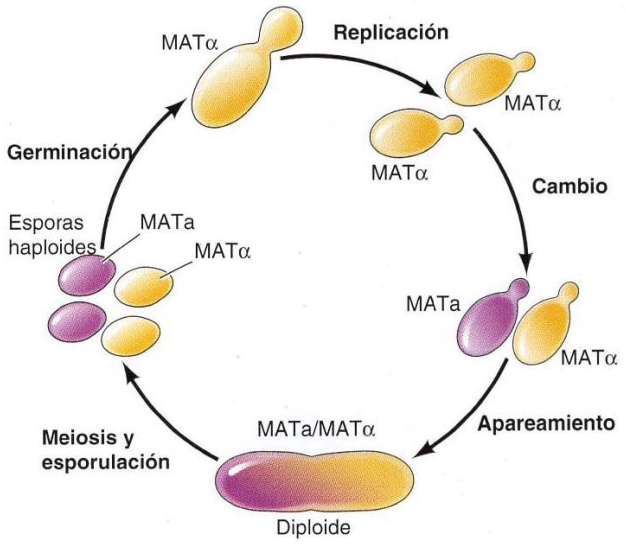


FIGURA 7.31 Ciclo vital de *S. cerevisiae*. La levadura MATα haploide se replica para generar una población MATα. El cambio en el locus de tipo apareamiento produce una mezcla de haploides MATa y MATα, que pueden aparearse para formar un diploide MATa/MATα. En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura diploide experimenta una meiosis para producir cuatro esporas haploides. En condiciones favorables, las esporas germinan y se replican como haploides.

cromosoma 3 de *S. cerevisiae* (**Fig. 7.32**). Uno de estos loci (*MAT*) es transcripcionalmente activo y la identidad del alelo (*MAT*a o *MAT*α) en el locus *MAT* determina el fenotipo de la célula haploide. Los otros dos loci (*HMR*a y *HML*α) son transcripcionalmente inactivos y contienen alelos no expresados de *MAT*a y *MAT*α, respectivamente. El cambio de tipo de apareamiento está mediado por la recombinación entre el alelo activo en el locus *MAT* y el alelo inactivo alternativo en *HMR*a o *HML*α. El proceso es iniciado por una endonucleasa denominada HO, que escinde específicamente el ADN en el locus *MAT* activo para introducir una rotura de doble hebra. Las hebras simples son resecadas a continuación por endonucleasas 5′ a 3′ y el hueco es ocupado por la síntesis de una nueva copia usando el alelo *HMR*a o *HML*α inactivo como donador. El resultado es la sustitución del alelo *MAT* original (p. ej., *MAT*α) por su alelo alternativo (p. ej., *MAT*a), mientras que *HMR*a y *HML*α permanecen en su estado original.

Genes de anticuerpos

El desarrollo del sistema inmune de vertebrados, que reconoce las sustancias extrañas **(antígenos)** y proporciona protección frente a agentes infecciosos, es un gran ejemplo del cambio de ADN programado en los eucariotas superiores. Hay dos clases principales de respuesta inmune, que están mediadas por linfocitos B y T. Los linfocitos B secretan anticuerpos **(inmunoglobulinas)** que reaccionan con antígenos solubles; los linfocitos T expresan proteínas de superficie celular (denominadas **receptores de células T**) que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de otras células. La característica clave tanto de las inmunoglobulinas y de los receptores de células T es su enorme diversidad, que permite que diferentes anticuerpos o moléculas receptoras de células T reconozcan una amplia gama de antígenos extraños. Por ejemplo, cada individuo es capaz de pro-

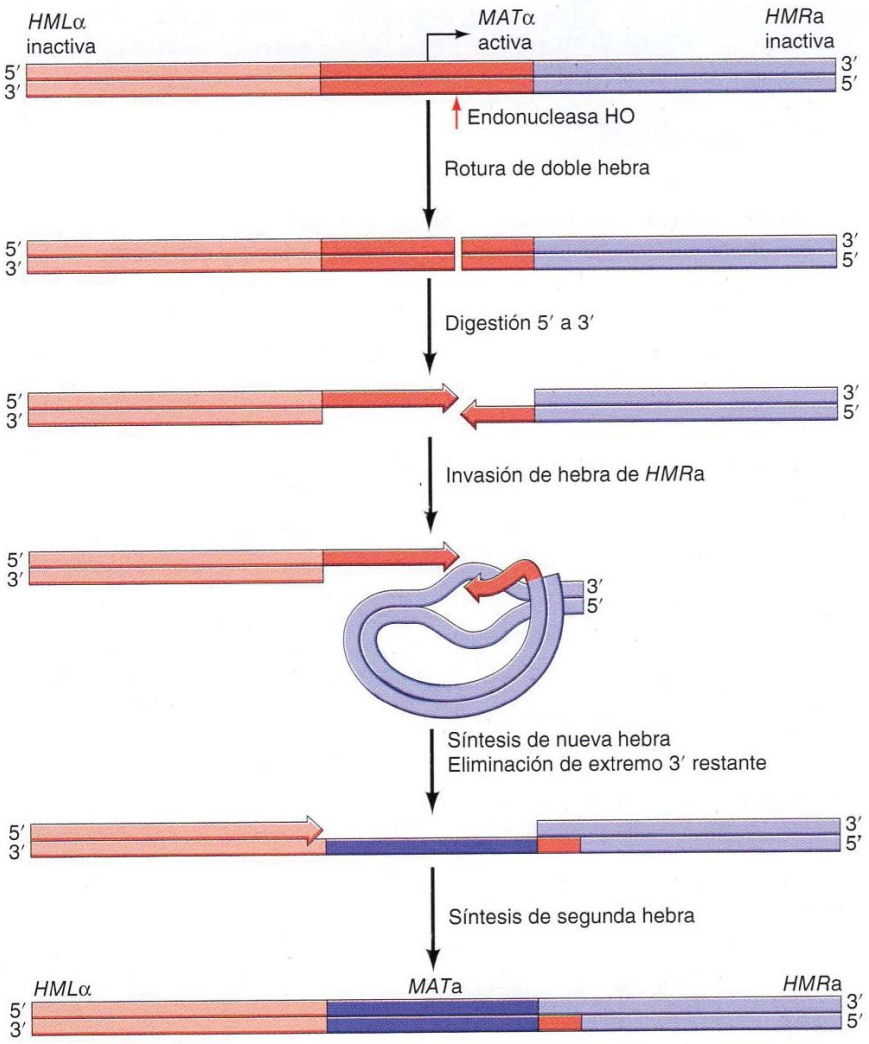


FIGURA 7.32 Cambio de tipo de apareamiento. *S. cerevisiae* tiene un locus *MAT* activo (*MAT*α en el ejemplo mostrado) y dos loci inactivos, *HML*α y *HML*a. El cambio es iniciado por la endonucleasa HO, que introduce una rotura de doble hebra en el locus *MAT* activo. Las dos hebras de ADN en la rotura son digeridas por nucleasas en la dirección 5' a 3', con lo que quedan extremos 3' salientes. Uno de estos extremos 3' invade el alelo inactivo alternativo, en este caso *HML*a, y ceba la síntesis de una nueva hebra usando *HMRa* como molde. El extremo 3' restante es eliminado y se sintetiza una segunda hebra. El resultado es la síntesis de una nueva copia en el locus *MAT*, lo que da lugar a un cambio a *MAT*a.

ducir más de 10^{11} moléculas de anticuerpo diferentes, que excede con creces el número total de genes presentes en los genomas de mamíferos (aproximadamente 21.000). En lugar de estar codificados en el ADN germinal, estos diversos anticuerpos (y receptores de células T) están codificados por el sistema inmune como resultado de una recombinación específica de lugar entre distintos segmentos de los genes de inmunoglobulinas y receptores de células T.

El papel de la recombinación de sitio específico en la formación de los genes de las inmunoglobulinas lo demostró por primera vez Susumu Tonegawa en 1976. Las inmunoglobulinas consisten en pares de cadenas de nucleótidos pesadas y ligeras idénticas (**Fig. 7.33**). Las cadenas pesadas y ligeras se

EXPERIMENTO CLAVE

Reorganización de los genes de inmunoglobulinas

Evidencia de la reorganización somática de genes de inmunoglobulina que codifican las regiones variable y constante

Nobumichi Hozumi y Susumu Tonegawa
Instituto de Inmunología de Basel, Basel, Suiza

Procedings of the National Academy of Sciences, USA, Volumen 73, 1976, págs. 3628-3632

Susumu Tonegawa

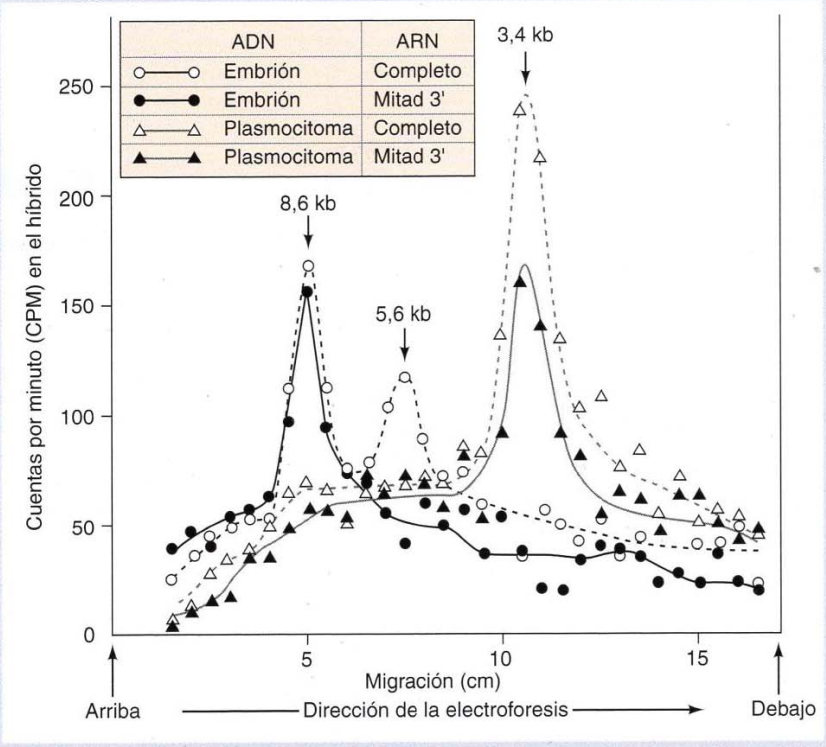
Contexto

La capacidad del sistema inmune de los vertebrados para reconocer a una variedad infinita de moléculas extrañas implica que los linfocitos son capaces de producir la correspondiente vasta diversidad de anticuerpos. Ya que esta diversidad de anticuerpos es la clave del reconocimiento inmune, comprender el mecanismo mediante el cual aparentemente se codifica un número ilimitado de diferentes inmunoglobulinas en el ADN genómico es uno de los principales temas que trata la inmunología.

Previamente a los experimentos de Hozumi y Tonegawa, la secuenciación de proteínas de varias inmunoglobulinas había demostrado que las cadenas ligeras y pesadas se componían de distintas regiones variables y constantes. Estudios genéticos posteriores indicaron que los ratones solo heredaban copias simples de los genes de la región constante. Estas observaciones condujeron a proponer que las inmunoglobulinas están codificadas por múltiples genes de regiones variables que pueden asociarse con un gen de región constante. El descubrimiento de las reorganizaciones genéticas de las inmunoglobulinas por Hozumi y Tonegawa proporcionó la primera base experimental para esta hipótesis y supuso el inicio del entendimiento de la base molecular de la diversidad de anticuerpos.

Experimentos

Hozumi y Tonegawa probaron la posibilidad de que los genes que codifican las regiones variable y constante de las inmunoglobulinas estuvieran unidos a nivel del ADN durante el desarrollo de los linfocitos. Se aproximaron experimentalmente utilizando la digestión por endonucleasas de restricción para comparar la organización de las secuencias de las regiones variable y constante en ADN extraídos de embriones de ratón y de células de un plasmocitoma de ratón (un tumor de linfocitos B que produce una sola especie de inmunoglobulinas). Los ADN del embrión y el plasmocitoma fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, separándose los fragmentos de diferentes tamaños por electroforesis en gel de agarosa. El gel se cortó en láminas, y el ADN extraído de cada lámina fue hibridado con sondas marcadas radiactivamente preparadas a partir de ARNm de



Gel de electroforesis de los ADN de embrión y plasmocitoma digeridos con *BamHI* e hibridados con sondas correspondientes al ARNm completo o a la parte 3′ del ARNm del plasmocitoma. Los datos están representados tal y como se detectó la radioactividad en las moléculas híbridas con ADN en cada porción de gel.

EXPERIMENTO CLAVE

inmunoglobulinas aisladas de las células del plasmocitoma. Se utilizaron dos sondas, correspondientes al ARNm completo de la inmunoglobulina o al extremo 3′ del ARNm, compuesto exclusivamente de secuencias con regiones constantes.

El resultado fundamental fue la obtención de patrones completamente distintos para las secuencias de las regiones variables y las regiones constantes detectadas en el ADN del embrión en comparación con los encontrados en el ADN del plasmocitoma (véase figura). En el ADN del embrión, la sonda completa hibrida con dos fragmentos *Bam*HI de unas 8,6 y 5,6 kb, respectivamente. Solamente el fragmento de 8,6 kb hibrida con la sonda 3′, sugiriendo que el fragmento de 8,6 kb contiene las secuencias de la región constante y que el fragmento de 5,6 kb contiene las secuencias de la región variable. Por el contrario, ambas sondas hibridan con un solo fragmento de 3,4 kb en el ADN del plasmocitoma. La interpretación de estos resultados fue que las secuencias de la región variable y constante estaban separadas en el ADN del embrión pero que se reorganizaron para formar un solo gen de inmunoglobulina durante el desarrollo del linfocito.

Impacto

Los resultados iniciales de Hozumi y Tonegawa, basados en los datos relativamente indirectos del mapeo con la endonucleasa de restricción, se confirmaron y ampliaron a través de la clonación y secuenciación molecular de los genes de inmunoglobulinas. Estos estudios establecieron que estos genes se generan por recombinación específica de sitio entre distintos segmentos de ADN en los linfocitos B. En los linfocitos T, reorganizamientos similares del ADN son los responsables de la formación de los genes codificadores de los receptores de células T. Por tanto, la recombinación y las reorganizaciones genéticas programadas son esenciales para el desarrollo del sistema inmune.

Estudios posteriores han demostrado que las regiones variables de las inmunoglobulinas y los receptores de células T se generan mediante reorganizaciones de dos o tres segmentos diferentes de ADN. La habilidad de estos segmentos para recombinarse, junto a una frecuencia elevada de mutaciones introducidas en los sitios de recombinación, es la responsable de la diversidad de las inmunoglobulinas y los receptores de células T. El descubrimiento de las reorganizaciones genéticas de las inmunoglobulinas proporcionó las bases para llegar a entender cómo el sistema inmune puede reconocer y responder a una variedad virtualmente ilimitada de sustancias ajenas.

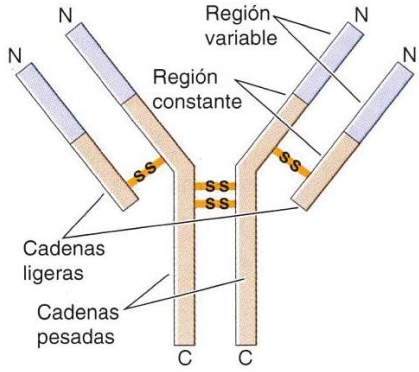


FIGURA 7.33 Estructura de una inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se componen de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, unidas por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras presentan regiones variables y constantes. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras contienen regiones N-terminal variables y C-terminal constantes.

componen de regiones C-terminal constantes y regiones N-terminal variables. Las regiones variables, que contienen diferentes secuencias de aminoácidos en diferentes moléculas de inmunoglobulinas, son las responsables de la unión con el antígeno, y es la diversidad de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables las que permiten a los anticuerpos de un individuo reconocer a antígenos únicos. Aunque cada individuo es capaz de producir un vasto espectro de anticuerpos distintos, cada linfocito B produce un solo tipo de anticuerpo. El descubrimiento clave de Tonegawa fue que cada anticuerpo está codificado por genes únicos formados por recombinación específica de sitio durante el desarrollo de los linfocitos B. Estas reorganizaciones genéticas crean diferentes genes de inmunoglobulinas en los diferentes linfocitos B del individuo, de manera que la población aproximada de 10^{12} linfocitos B en el cuerpo humano incluye células capaces de producir anticuerpos en contra de una gran diversidad de antígenos.

Los genes que codifican las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas constan de tres regiones: una región V que codifica entre 95 y 96 aminoácidos N-terminales de la región polipeptídica variable; una región de unión (J) que codifica entre 12 y 14 aminoácidos C-terminales de la región polipeptídica variable; y una región C que codifica a la región polipeptídica constante (**Fig. 7.34**). La clase principal de genes que codifican la cadena ligera en el ratón se forman por la combinación de aproximadamente 150 regiones V y cuatro regiones J con una sola región C. La recombinación específica de sitio durante el desarrollo de los linfocitos conduce a la reorganización del gen en la que una sola región V se recombina con una sola región J para generar un gen de cadena ligera funcional. Diferentes regiones V y J se reorganizan en diferentes linfocitos B, de modo que las combinaciones posibles de 150 regiones V con cuatro regiones J pueden generar aproximadamente 600 (4 ×150) cadenas ligeras únicas.

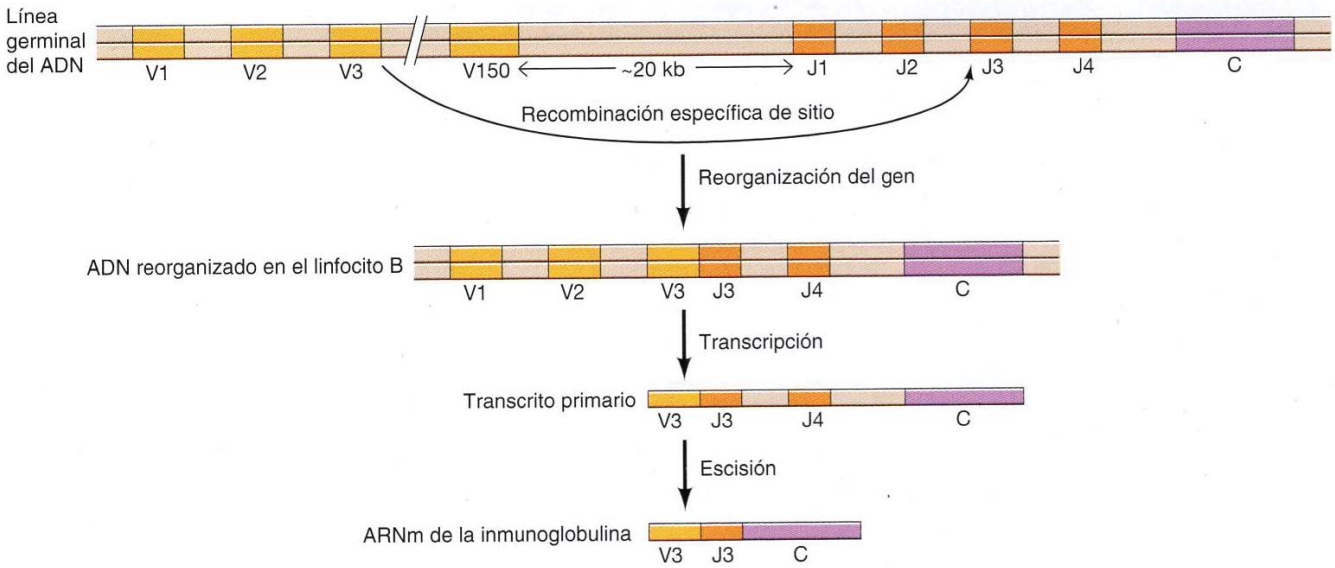


FIGURA 7.34 Reorganización de los genes de cadena ligera de las inmunoglobulinas. Cada gen de cadena ligera (se ilustran las cadenas ligeras κ del ratón) consta de una región variable (V), una región de unión (J) y de una región constante (C). Existen aproximadamente 150 regiones V diferentes, que están separadas de J y C por unas 20 kb en la línea germinal del ADN. Durante el desarrollo de los linfocitos B, la recombinación específica de sitio une una de las regiones V a una de las cuatro regiones J. Esta reorganización activa la transcripción, resultando la formación de un transcrito primario que contiene la región organizada VJ junto con las regiones J y C restantes. Las regiones J no utilizadas y los intrones entre J y C se eliminan por escisión, produciendo un ARNm funcional.

Los genes de las cadenas pesadas incluyen una cuarta región (conocida como la de diversidad, o región D), que codifica los aminoácidos situados entre las regiones V y J (**Fig. 7.35**). El ensamblaje del gen funcional de la cadena pesada requiere dos procesos de recombinación: Una región D se recombina con una región J, y después una región V se recombina con el segmento recombinado DJ. En el ratón, existen alrededor de 150 regiones V de cadena pesada, 12 regiones D, y 4 regiones J, por lo que el número total de cadenas pesadas que se pueden generar mediante los procesos de recombinación es alrededor de 7.200 ($150 \times 12 \times 4$).

Las combinaciones entre las 600 cadenas ligeras diferentes y las 7.200 cadenas pesadas diferentes que se han formado por recombinación específica de sitio pueden generar aproximadamente 4×10^6 moléculas de inmunoglobulina diferentes. Esta diversidad aumenta aún más debido a que las uniones entre los segmentos genéticos de las inmunoglobulinas a menudo implican la pérdida o ganancia desde uno hasta varios nucleótidos, como se comenta más adelante. Las mutaciones que resultan de estas deleciones e inserciones incrementan la diversidad de las regiones variables de las inmunoglobulinas más de 100 veces, correspondiendo con la formación de unas 10^5 cadenas ligeras diferentes y 10^6 cadenas pesadas, que pueden combinarse después para formar aproximadamente 10^{11} anticuerpos distintos.

Los receptores de las células T de forma similar se componen de dos cadenas (llamadas α y β), cada una de ellas presentando regiones variables y constantes (**Fig. 7.36**). Los genes que codifican estos polipéptidos se generan por la recombinación entre los segmentos V y J (la cadena β) o entre los segmentos V, D y J (la cadena β), análogamente a la formación de los genes de las inmunoglobulinas. La recombinación específica de sitio entre los distin-

ANIMACIÓN 7.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a7.2

Genes de las cadenas ligeras. Durante el desarrollo de las células B, la recombinación específica de lugar une regiones de los genes de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas, dando lugar a la producción de cadenas ligeras de inmunoglobulina únicas.

ANIMACIÓN 7.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a7.3

Genes de las cadenas pesadas. La recombinación específica de lugar entre tres regiones da lugar a la formación de genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas.

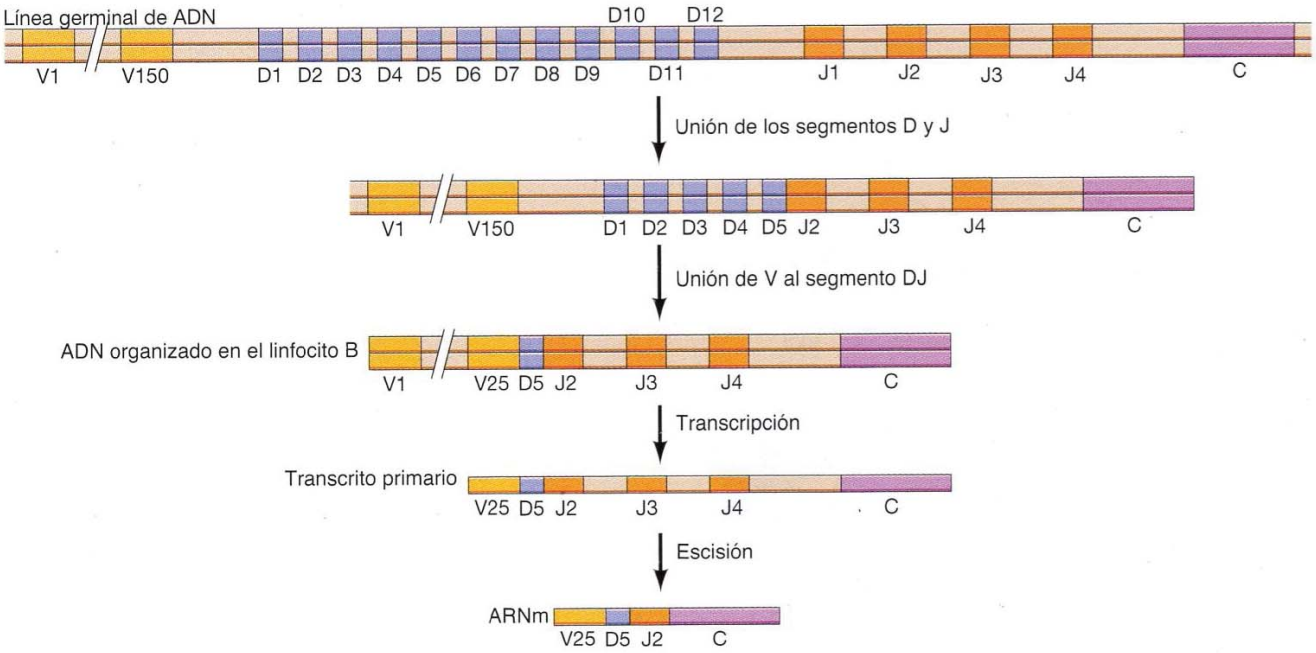


FIGURA 7.35 Reorganización de los genes de cadena pesada de las inmunoglobulinas. Los genes de la cadena pesada contienen regiones D además de regiones V, J y C. Primero se unen los segmentos D y J. Después se une un segmento V a la región ya organizada DJ. Los intrones entre J y C se eliminan por escisión para dar el ARNm de la cadena pesada.

tos segmentos de ADN, en combinación con las mutaciones introducidas durante la recombinación, genera un grado de diversidad de los receptores de células T similar al de las inmunoglobulinas.

La recombinación V(D)J está mediada por un complejo de dos proteínas, denominadas RAG1 y RAG2, que se expresan específicamente en linfocitos. Las proteínas RAG reconocen las secuencias señal de recombinación (RS) adyacentes a las secuencias codificadoras de cada segmento, e inician las reorganizaciones de ADN introduciendo una rotura de doble hebra entre las secuencias RS y las secuencias codificantes (**Fig. 7.37**). A continuación, se unen los extremos codificantes de los segmentos génicos para dar lugar a un gen reorganizado de inmunoglobulina o receptor de células T. Ya que estas roturas de doble hebra son unidas mediante un proceso de unión de extremos no homólogo (véase Fig. 7.28), la reacción de unión es frecuentemente acompañada de pérdida de nucleótidos. Adicionalmente, los linfocitos contienen una enzima especializada (desoxinucleotidil transferasa terminal) que añade nucleótidos al azar a los extremos de las moléculas de ADN, de modo que las mutaciones correspondientes tanto a la pérdida como a la ganancia de nucleótidos son introducidos durante la reacción de unión. Como se ha indicado anteriormente, estas mutaciones contribuyen sustancialmente a la diversidad de las inmunoglobulinas y receptores de células T.

Se genera incluso más diversidad de anticuerpos tras la formación de genes de inmunoglobulina reordenados mediante dos procesos que tienen lugar sólo en los linfocitos B: la recombinación de cambio de clase y la hipermutación somática. La **recombinación de cambio de clase** resulta en la asociación de regiones reordenadas V(D)J con diferentes regiones constantes de cadenas pesadas, generando la producción de anticuerpos con distintos papeles funcionales en la respuesta inmune. Los mamíferos producen

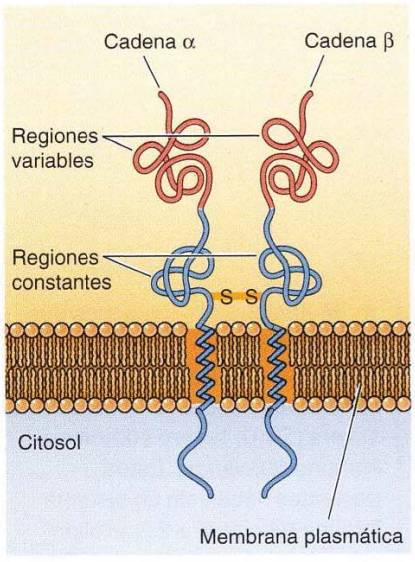


FIGURA 7.36 Estructura de un receptor de células T. Los receptores de células T se componen de dos cadenas polipeptídicas (α y β) que atraviesan la membrana plasmática y que están unidas por puentes disulfuro. Las cadenas α y β se componen de regiones variables y constantes.

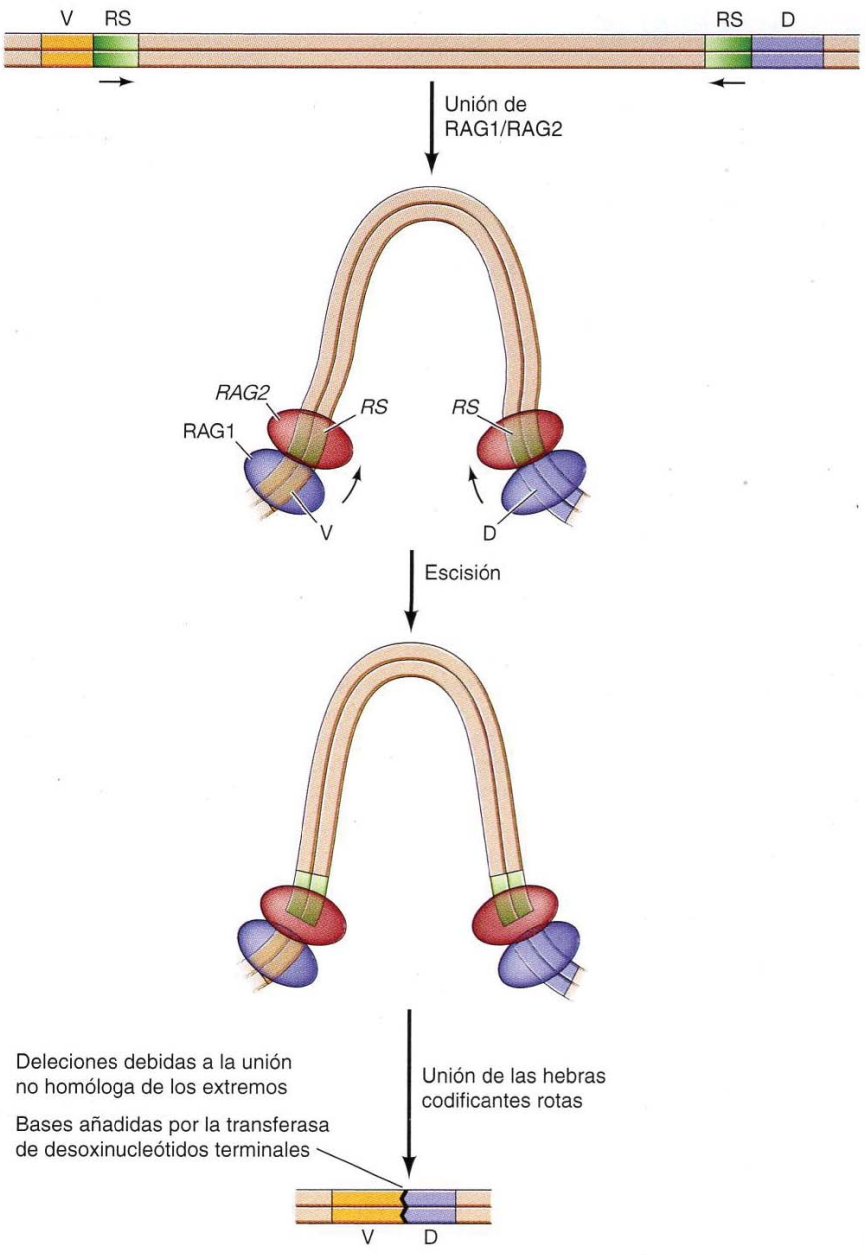


FIGURA 7.37 Recombinación V(D)J. Los secuencias codificadoras de los genes de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (p. ej., un segmento V y D) están flanqueados por secuencias señal de recombinación cortas (RS), opuestamente orientadas en los extremos 5′ y 3′ de las secuencias codificadoras. Las RS son reconocidas por un complejo de proteínas de recombinación específica de linfocitos RAG1 y RAG2, que rompen el ADN entre las secuencias *codificadoras y las RS. Las hebras codificadoras rotas se unen para* producir un segmento del gen reorganizado. Las mutaciones resultan de la pérdida de bases en los *extremos durante la unión no* homóloga de los extremos, además de la adición de bases por parte de la desoxinucleotidil transferasa.

cuatro clases diferentes de imunoglobulinas —IgM, IgG, IgE e IgA— con cadenas pesadas codificadas por una región variable unida a las regiones constantes Cμ, Cγ, Cε y Cα, respectivamente. Adicionalmente, hay varias subclases de IgG, que están codificadas por distintas regiones Cγ. Las diferentes clases de inmunoglobulinas están especializadas para eliminar antígenos de diferentes formas. La IgM activa el complemento (un grupo de proteínas séricas que destruyen las células invasoras y los virus), de modo que los anticuerpos IgM son una primera línea de defensa efectiva frente a infecciones bacterianas o víricas. Los anticuerpos IgG, las inmunoglobulinas más abundantes en suero, no sólo activan el complemento sino que también se unen a receptores presentes en la superficie de células fagocíticas. Adicionalmente, los anticuerpos IgG pueden cruzar la placenta desde la circulación materna, proporcionando protección inmunológica al feto. Los anticuerpos IgA son secretados en una diversidad de fluidos corpora-

◆ Mutaciones en los genes que codifican para RAG1 y RAG2 pueden dar lugar a la inmunodeficiencia combinada severa (SCID: *severe combined immunodeficiency*). Estos pacientes nacen sin un sistema inmune funcional y desarrollan infecciones letales si se les deja sin tratamiento. Los tratamientos incluyen vivir en un ambiente libre de gérmenes (en «burbujas» de plástico), trasplante con células madre que dan lugar a un sistema inmune funcional, y terapia génica (véase Cap. 18).

les, como el moco nasal y la saliva, donde pueden unirse y eliminar bacterias invasoras o virus para prevenir una infección. Los anticuerpos IgA también son secretados en la leche materna, de modo que proporcionan protección inmunológica a los recién nacidos. Los anticuerpos IgE son efectivos en la protección frente a infecciones parasíticas, y también son la clase de anticuerpos responsables de las alergias.

El reordenamiento V(D)J inicial produce una región variable unida a Cμ, resultando en la producción de anticuerpos IgM. La recombinación de cambio de clase a continuación transfiere una región variable reordenada a una nueva región constante, con la deleción del ADN intermedio (**Fig. 7.38**). La recombinación tiene lugar entre las secuencias altamente repetidas en las regiones de cambio (S: *switch region*) que se localizan inmediatamente antes de cada región C. Las regiones de cambio son de 2-10 kb de largo y la recombinación puede tener lugar en cualquier parte de estas regiones, de modo que el cambio de clase es descrito de forma más correcta como un evento específico de región en lugar de específico de lugar. Puesto que las regiones de cambio se encuentran dentro de intrones, el punto preciso en que se produce la recombinación de cambio de clase no afecta a la secuencia codificadora de la inmunoglobulina.

La **hipermutación somática** incrementa la diversidad de inmunoglobulinas produciendo múltiples mutaciones dentro de las regiones variables reordenadas tanto de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Estas mutaciones, principalmente sustituciones de una sola base, tienen lugar con frecuencias tan elevadas como 10^{-3}, aproximadamente un millón de veces más que las tasas normales de mutación espontánea. Dan lugar a la producción de inmunoglobulinas con una afinidad por el antígeno sustancialmente incrementada, y por tanto, son una contribución importante para una respuesta inmune efectiva.

La recombinación de cambio de clase y la hipermutación somática son tipos nuevos de alteraciones genéticas programadas, y los mecanismos moleculares implicados son áreas de investigación muy activa. Un jugador clave en ambos procesos es la enzima denominada **deaminasa inducida por acti-**

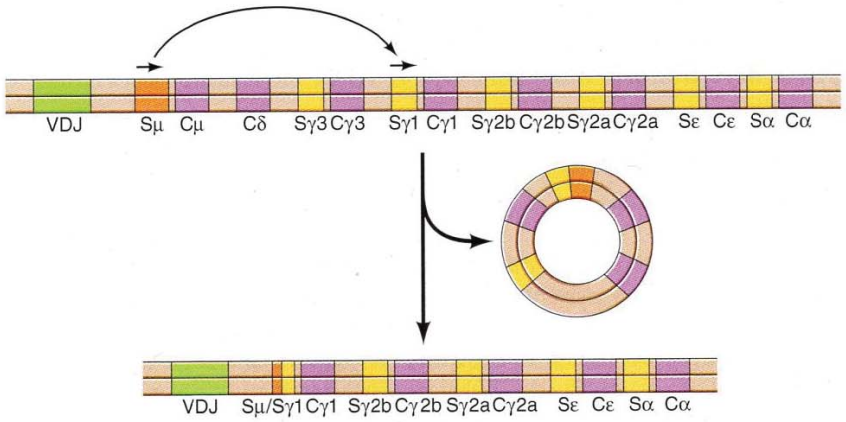


FIGURA 7.38 Recombinación por cambio de clase. El cambio de clase tiene lugar mediante recombinación entre regiones repetidas de cambio (S) que se encuentran antes de una serie de regiones constantes (C) en el locus de la cadena pesada (se muestra el locus de ratón). En el ejemplo mostrado, una región V(D)J es transferida de Cμ a Cγ1 mediante la recombinación entre las regiones de cambio Sμ y Sγ1. El ADN intermedio es escindido en forma de una molécula circular.

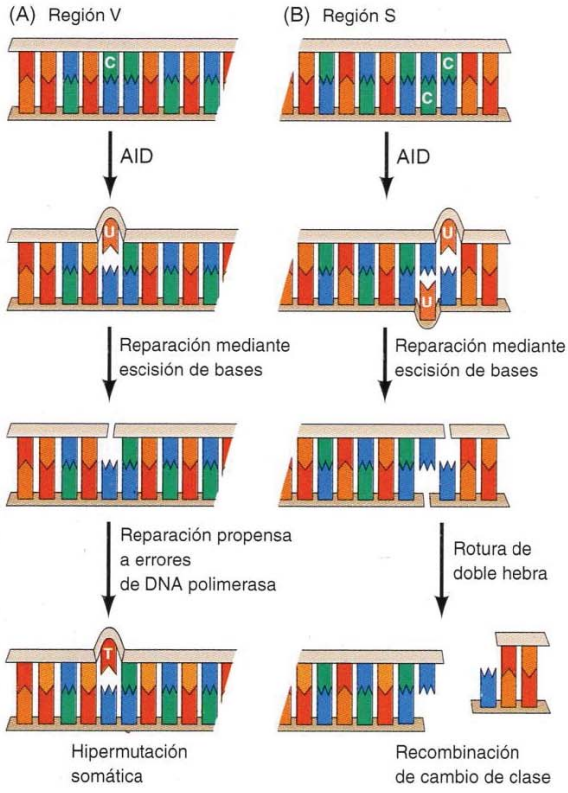


FIGURA 7.39 Modelo del papel de AID durante la hipermutación somática y la recombinación de cambio de clase. La deaminasa inducida por activación (AID) enzima deamina a C para dar U en el ADN. La eliminación de U por parte de la reparación por escisión de bases (véase Fig. 7.21) deja un hueco de una sola hebra en el ADN. (A) En las regiones variables (V), los errores producidos durante la reparación pueden dar lugar a la hipermutación somática, posiblemente resultando de la acción de una ADN polimerasa propensa a errores especializada (véase Fig. 7.27). (B) En las regiones de cambio (S), la escisión de bases de hebras opuestas puede resultar en roturas de doble hebra que estimulan la recombinación de cambio de clase.

vación (AID: *activation-induced deaminase*), que fue descubierta por Tasuku Honjo y sus colaboradores en 1999. AID se expresa solamente en linfocitos B, y es necesaria tanto para la recombinación de cambio de clase, como para la hipermutación somática. AID cataliza la deaminación de citosina en ADN para formar uracilo (**Fig. 7.39**). Esta acción resulta en la conversión de C → U en las regiones variables y regiones de cambio de los genes de inmunoglobulina, dando lugar a la recombinación de cambio de clase y a la hipermutación somática, respectivamente. Los mecanismos por los que las mutaciones C → U estimulan estos procesos no se comprenden por completo, pero un paso importante parece ser la eliminación de U mediante reparación por escisión de bases (véase Fig. 7.21). En las regiones de cambio (que tienen un mayor contenido de pares de bases GC) se forman roturas de doble hebra como consecuencia de la eliminación de roturas de los residuos de uracilo en las hebras opuestas. A continuación tiene lugar un proceso de recombinación de cambio de clase debido a la reparación de estas roturas en distintas regiones de cambio mediante la unión de extremos no homólogos (véase Fig. 7.28). En las regiones variables, se cree que la hipermutación somática podría deberse a la elevada tasa de errores durante la reparación de mutaciones C → U, posiblemente como consecuencia de la reparación efectuada por ADN polimerasas especializadas propensas a errores (véase Fig. 7.27). A pesar de que los detalles de estos procesos sigan sin dilucidarse, resulta evidente que AID es una enzima muy interesante con el novedoso papel de introducir mutaciones en el ADN en estadios específicos del desarrollo.

Amplificación génica

Las reorganizaciones del ADN que hemos discutido hasta ahora alteraban la posición de una secuencia de ADN dentro del genoma. La **amplificación génica** puede entenderse como un tipo diferente de alteración en la estructura del genoma; incrementa el número de copias de un gen dentro de una célula. La amplificación génica es el resultado de la repetición de la replicación del ADN, produciendo múltiples copias de una región en particular (**Fig. 7.40**). Las secuencias de ADN amplificadas se pueden encontrar en forma de moléculas extracromosómicas libres o como distribuciones en tándem de secuencias dentro del cromosoma. En cualquier caso, el resultado es el aumento de la expresión del gen amplificado, simplemente debido a que están disponibles más copias del gen que será transcrito.

En algunos casos, la amplificación génica es responsable del aumento programado durante el desarrollo de la expresión genética. El ejemplo clásico es la amplificación de los genes de ARN ribosómico en los oocitos (hue-

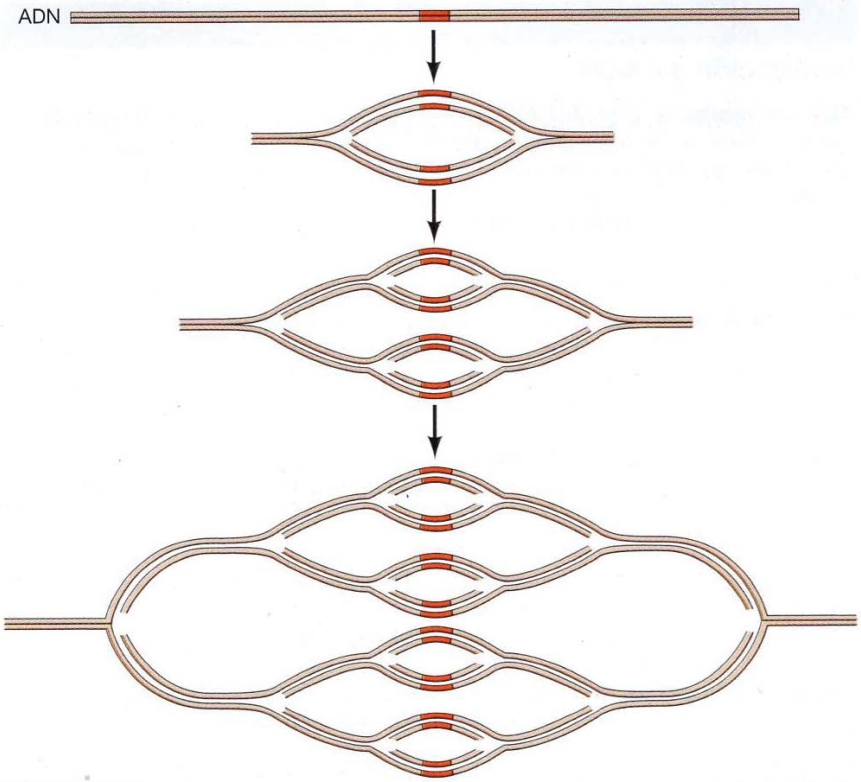


FIGURA 7.40 Amplificación del ADN. Repetidas vueltas de replicación del ADN producen múltiples copias de una región cromosómica particular.

vos sin fertilizar) de los anfibios. Los huevos son células extremadamente grandes, que requieren una síntesis de proteínas muy alta. Los oocitos de los anfibios en particular son aproximadamente un millón de veces más grandes en volumen que una célula somática típica y deben proporcionar grandes cantidades de síntesis de proteínas durante el desarrollo temprano. Para ello es necesario aumentar la síntesis del ARN ribosómico, resuelta en parte por la amplificación de los genes del ARN ribosómico. Los genes para el ARN ribosómico ya están presentes en varios cientos de copias por genoma, de manera que se puede producir el suficiente ARNr para atender las necesidades de las células somáticas. En los huevos de los anfibios, estos genes se amplifican 2.000 veces más, aproximadamente un millón de copias por oocito. Otro ejemplo de amplificación génica programada se da en *Drosophila*, en donde los genes que codifican a las proteínas del corion (genes del corion) se amplifican en las células del ovario para producir grandes cantidades de estas proteínas. Al igual que otras reorganizaciones programadas, sin embargo, la amplificación génica es un proceso relativamente infrecuente que ocurre en tipos de células altamente especializadas; no es un mecanismo común en la regulación génica.

La amplificación génica también ocurre como un proceso anormal en las células cancerígenas, en las que, a menudo, incrementa la expresión de los genes que dirigen la proliferación celular (oncogenes), lo que da lugar al crecimiento celular incontrolado y el desarrollo de tumores (véase Cap. 19). Por tanto, al igual que en otros tipos de reorganizaciones del ADN, la amplificación génica puede tener consecuencias beneficiosas o desfavorables para la célula o el organismo en el que tenga lugar.

RESUMEN

Replicación del ADN

ADN polimerasas: Distintas ADN polimerasas desempeñan funciones diferentes en la replicación y reparación del ADN en las células procariotas y eucariotas. Todas las ADN polimerasas conocidas sintetizan el ADN exclusivamente en sentido de 5′ a 3′ mediante la adición de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) a la hebra cebadora de ADN.

Ver Vídeo 7.1

PALABRAS CLAVE: **ADN polimerasa**

Horquilla de replicación: Las hebras parentales de ADN se separan y sirven de molde para la síntesis de dos nuevas hebras en la horquilla de replicación. Una de las hebras nuevas de ADN (la hebra conductora) se sintetiza de manera continua; la otra hebra (la hebra rezagada) se forma por la unión de pequeños fragmentos de ADN que son sintetizados «marcha atrás» con respecto al sentido de la replicación. Las ADN polimerasas y otras muchas proteínas actúan de manera coordinada para sintetizar a las hebras conductora y rezagada del ADN.

Ver Animación 7.1

horquilla de replicación, fragmento de Okazaki, ADN ligasa, hebra conductora, hebra tardía, primasa, exonucleasa, ARNasa H, helicasa, proteína de unión a la hebra simple de ADN, topoisomerasa

Fidelidad de la replicación: Las ADN polimerasas aumentan la exactitud de la replicación a través de la selección de la base correcta y la doble lectura del ADN recién sintetizado para eliminar las bases desapareadas.

doble lectura

Orígenes e inicio de la replicación: La replicación del ADN comienza en orígenes específicos de replicación, que contienen los sitios de unión para las proteínas que inician el proceso. En los eucariotas superiores, los orígenes pueden estar definidos por la estructura cromatínica en lugar de por una secuencia de ADN.

origen de replicación, secuencia de replicación autónoma (ARS), complejo de origen de replicación (ORC)

Telómeros y telomerasa: replicación de los extremos del cromosoma: Las secuencias repetidas teloméricas en los extremos de los cromosomas se replican por la acción de la transcriptasa inversa (telomerasa) que contiene su propio molde de ARN.

telómero, telomerasa, transcriptasa inversa

Reparación del ADN

Inversión directa del ADN dañado: Algunos tipos de lesiones comunes del ADN, como los dímeros de pirimidina y los residuos de guanina alquilados, son reparados por la inversión directa del daño.

dímero de pirimidina, fotorreactivación

Reparación por escisión: La mayoría de los daños en el ADN son reparados mediante la escisión del ADN dañado. El espacio resultante se rellena con ADN recién sintetizado, usando a la hebra complementaria no dañada como molde. En la reparación por escisión de las bases, se elimina de la molécula de ADN a tipos específicos de bases dañadas. Por el contrario, los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos reconocen a una vasta variedad de bases dañadas como parte de un oligonucleótido. Un tercer tipo de sistema de reparación por escisión elimina específicamente las bases desemparejadas de las hebras de ADN recién sintetizadas.

Ver Vídeo 7.2

reparación por escisión de bases, ADN glicosilasa, AP endonucleasa, reparación por escisión de nucleótidos, escinucleasa, reparación acoplada a la transcripción, reparación de errores

Síntesis de ADN translesión: ADN polimerasas especializadas son capaces de replicar el ADN opuesto a un punto de ADN dañado, aunque la acción de estas polimerasas resulta en una elevada frecuencia de incorporación de bases incorrectas.

síntesis de ADN translesión

Reparación de roturas de doble hebra: Las roturas de doble hebra se reparan por medio de la unión de las hebras dañadas mediante recombinación. La reparación recombinatoria puede darse tanto por medio de recombinación homóloga con un cromosoma intacto como a través de la unión no homóloga de los extremos rotos de una molécula sencilla de ADN.

roturas de doble hebra, reparación recombinatoria, recombinación homóloga, RecA, Rad51

RESUMEN

Reorganización del ADN

Tipos de apareamientos en levaduras: El cambio entre los tipos de apareamientos en levaduras está mediado por una recombinación específica del sitio entre alelos activos e inactivos del locus de tipo de apareamiento.

recombinación específica de sitio

Genes de anticuerpos: En los vertebrados, la recombinación específica de sitio desempeña un papel esencial en la generación de inmunoglobulinas y genes de los receptores de las células T durante el desarrollo del sistema inmune. Se proporciona diversidad adicional a los genes de inmunoglobulinas mediante hipermutación somática y recombinación de cambio de clase.

antígeno, inmunoglobulina, receptor de células T, recombinación de cambio de clase, hipermutación somática, deaminasa inducida por activación (AID)

Ver Animaciones 7.2 y 7.3

Amplificación génica: La amplificación génica resulta de la replicación repetitiva de una región cromosómica. En algunos casos, la amplificación génica proporciona un mecanismo de aumento de la expresión de los genes durante el desarrollo. La amplificación génica también se produce con frecuencia en las células cancerígenas, pudiendo originar la elevada expresión de los genes que contribuyen a la proliferación celular incontrolada.

amplificación del gen

PALABRAS CLAVE

Preguntas

1. Has aislado una cepa sensible a la temperatura de *E. coli* con una mutación en la ADN polimerasa I. ¿Qué defectos, si los hay, observarías en bacterias que portan esta mutación a altas temperaturas?
2. Compara y contrasta las acciones de las topoisomerasas I y II.
3. ¿Cuál es el número aproximado de fragmentos de Okazaki sintetizados durante la replicación del genoma de levaduras?
4. ¿Por qué la síntesis de fragmentos de Okazaki se inicia por la primasa en lugar de una ADN polimerasa?
5. ¿Cuál es la función de la actividad exonucleasa de 3′ a 5′ de las ADN polimerasa? ¿Cuál sería la consecuencia de mutar esta actividad de la ADN polimerasa III sobre la fidelidad de la replicación del ADN de *E. coli*?
6. ¿Cómo averiguarías en una levadura si una secuencia de ADN posee un origen de replicación?
7. Las células de levadura requieren la telomerasa para replicar por completo su genoma, mientras que *E. coli* no requiere esta enzima especial. ¿Por qué?
8. ¿Qué mecanismo emplea una célula para reparar roturas de doble hebra en su ADN? ¿Cómo difiere esto de la reparación de las roturas en una sola hebra?
9. Los pacientes de xeroderma pigmentosa sufren una incidencia altísima de cáncer de piel aunque no se ha encontrado la misma incidencia en cánceres de órganos internos (p. ej., cáncer de colon). ¿Qué sugiere esto acerca de los daños del ADN responsables de la mayoría de los cánceres internos?
10. Muchos medicamentos de uso clínico para el tratamiento del sida son inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH. ¿Qué otros procesos celulares podrían verse afectados por estos inhibidores?
11. ¿El sistema de reparación de falsos apareamientos en humanos incluye los homólogos de *E. coli MutS* y *MutL* pero no de *MutH*. ¿Por qué?
12. ¿Qué fenotipo tendría un ratón mutante que carece de uno de los genes necesarios para la recombinación específica de sitio en los linfocitos?

Bibliografía

Replicación del ADN

Annunziato, A. T. 2005. Split decision: What happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* 280: 12065–12068. [R]

Armanios, M. and E. H. Blackburn. 2012. The telomere syndromes. *Nature Rev. Genet.* 13: 693–704. [R]

Bell, S. P. and A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 333–374. [R]

Bernandes de Jesus, B. and M. A. Blasco. 2013. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet.* 29: 513–520.[R]

Cozzarelli, N. R., G. J. Cost, M. Nollmann, T. Uiard and J. E. Stray. 2006. Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nature Mol. Cell Biol.* 7: 580–588. [R]

Frick, D. N. and C. C. Richardson. 2001. DNA primases. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 39–80. [R]

Gilbert, D. M. 2004. In search of the holy replicator. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 1–8. [R]

Greider, C. W. and E. H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405–413. [P]

Horn, S., A. Figl, P. S. Rachakonda, C. Fischer, A. Sucker, A. Gast, S. Kadel, I. Moll, E. Nagore, K. Hemminki, D. Schadendorf and R. Kumar. 2013. *TERT* promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339: 959-961. [P]

Huang, F. W., E. Hodis, M. J. Xu, G. V. Kryukov, L. Chin and L. A. Garraway. 2013. Highly recurrent *TERT* promoter mutations in human melanoma. *Science* 339: 957-959. [P]

Huberman, J. A. and A. D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32: 327–341. [P]

Johnson, A. and M. O'Donnell. 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Ann. Rev. Biochem.* 74: 283–315. [R]

Kornberg, A. 2000. Ten commandments: lessons from the enzymology of DNA replication. *J. Bacteriol.* 182: 3613–3618 [R]

Machida, Y. J., J. L. Hamlin and A. Dutta. 2005. Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123: 13–24. [R]

McCulloch, S. D. and T. A. Kunkel. 2008. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.* 18: 148–161. [R]

Mechali, M. 2010. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 728–738. [R]

Moldovan, G.-L., B. Pfander and S. Jentsch. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665–679. [R]

Nitiss, J. L. 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Rev. Cancer* 9: 327–337. [R]

Robinson, N. P. and S. D. Bell. 2005. Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J.* 272: 3757–3766. [R]

Stillman, B. 2008. DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Mol. Cell* 30: 259–260. [R]

Stinthcomb, D. T., K. Struhl and R. W. Davis. 1979. Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39–43. [P]

Reparación del ADN

Cleaver, J. E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218: 652–656. [P]

David, S. S., V. L. O'Shea and S. Kundu. 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447: 941–950. [R]

Essen, L. O. and T. Klar. 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1266–1277. [R]

Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027–1038. [P]

Friedberg, E. C., A. R. Lehmann and R. P. P. Fuchs. 2005. Trading places: How do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol. Cell* 18: 499–505. [R]

Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz and T. Ellenberger. 2005. *DNA Repair and Mutagenesis.* Washington, D.C.: ASM Press.

Hanawalt, P. C. and G. Spivak. 2008. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 958–970. [R]

Hegde, M. L., T. K. Hazra and S. Mitra. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18: 27–47. [R]

Jensen, R.B., A. Carreira and S. C. Kowalczykowski. 2010. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467: 678–683. [P]

Jiricny, J. 2006. The multifaceted mismatch repair system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 335–346. [R]

Leach, F. S. and 34 others. 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215–1225. [P]

Lehmann, A. R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J. F. Wing, P. L. Kannouche and C. M. Green. 2007. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* 6: 891–899. [R]

Lieber, M. R. 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 283: 1–5. [R]

Marteijn, J. A., H. Lans, W. Vermeulen and J. H. Hoeijmakers. 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 465–481. [R]

Mimitou, E. P. and L. S. Symington. 2009. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* 34: 264–272. [R]

Pena-Diaz, J. and J. Jiricny. 2012. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends Biochem. Sci.* 37: 206–214. [R]

San Filippo, J., P. Sung and H. Klein. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 77: 9.1–9.29. [R]

Savery, N. J. 2007. The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends Microbiol.* 15: 326–333. [R]

Sedgwick, B., P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs and T. Lindahl. 2007. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair* 6: 429–442. [R]

Thorlund, T. and S. C. West. 2007. BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 26: 7720–7730. [R]

Yang, W. and R. Woodgate. 2007. What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15591–15598. [R]

Reorganización del ADN

Chaudhuri, J. and F. W. Alt. 2004. Class-switch recombination: Interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nature Rev. Immunol.* 4: 541–552. [R]

Claycomb, J. M. and T. L. Orr-Weaver. 2005. Developmental gene amplification: Insights into DNA replication and gene expression. *Trends Genet.* 21: 149–162. [R]

Di Noia, J. M. and M. S. Neuberger. 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 1–22. [R]

Haber, J. E. 2012. Mating-type genes and *MAT* switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191: 33-64. [R]

Honjo, T., H. Nagaoka, R. Shinkura and M. Muramatsu. 2005. AID to overcome the limitations of genomic information. *Nature Immunol.* 6: 655–661. [R]

Hozumi, N. and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3628–3632. [P]

Jung, D. and F. W. Alt. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Ann. Rev. Immunol.* 24: 541–570. [R]

Maizels, N. 2005. Immunoglobulin gene diversification. *Ann. Rev. Genet.* 39: 23–46. [R]

Maul, R. W. and P. J. Gearhart. 2010. AID and somatic hypermutation. *Adv. Immunol.* 105: 159–191. [R]

Schatz, D. G. and Y. Ji. 2011. Recombination centres and the orchestration of V[D]J recombination. *Nature Rev. Immunol.* 11: 251–263. [R]

Teng, G. and F. N. Papavasiliou. 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Ann. Rev. Genet.* 41: 107–120. [R]

Tower, J. 2004. Developmental gene amplification and origin regulation. *Ann. Rev. Genet.* 38: 273–304. [R]

Capítulo 8

Síntesis y maduración del ARN

Transcripción en bacterias 259

ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales 265

Regulación de la transcripción en eucariotas 271

Cromatina y epigenética 284

Maduración y renovación del ARN 295

EXPERIMENTO CLAVE: Aislamiento de un factor de transcripción eucariótico 279

EXPERIMENTO CLAVE: Descubrimiento del RNPsn 304

En los capítulos 6 y 7 se trata la organización y mantenimiento del ADN genómico, que es considerado como el conjunto de instrucciones que dirigen todas las actividades celulares. Estas instrucciones se llevan a cabo por medio de la síntesis de ARN y proteínas. El comportamiento de una célula está determinado no sólo por el conjunto de genes que ha heredado sino también por cuáles de estos genes se expresan en un momento determinado. La regulación de la expresión génica permite a las células adaptarse a los cambios en el ambiente y es responsable de las distintas actividades llevadas a cabo por los múltiples tipos celulares que componen a los animales y plantas complejos. Casi todas las células de los organismos multicelulares tienen el mismo ADN genómico. Las células musculares y hepáticas, por ejemplo, contienen los mismos genes; la función de estas células está determinada no por diferencias en sus genomas, sino por patrones regulados de expresión génica que dirigen el desarrollo y la diferenciación.

El primer paso en la expresión de un gen, la transcripción del ADN a ARN, es el nivel primario de regulación de la expresión génica en procariotas y eucariotas. En células eucariotas los ARN son modificados de varias formas —por ejemplo, eliminando los intrones por corte y empalmado— para transformar el transcrito primario en su forma funcional. Los distintos tipos de ARN tienen diferentes funciones en las células: el ARN mensajero (ARNm) sirve de molde para la síntesis de proteínas; el ARN ribosómico (ARNr) y el ARN de transferencia (ARNt) participan en la traducción del ARNm. Otros ARN de pequeño tamaño intervienen en el corte y empalmado de ARNm y en la clasificación de proteínas en eucariotas. De hecho, algunos de los avances más interesantes en los últimos años están relacionados con los papeles de ARN no codificantes como reguladores tanto de la expresión génica como de la traducción en células eucariotas. En este capítulo se discuten los procesos de síntesis y maduración del ARN. El paso final de la expresión génica, la traducción del ARNm a proteínas, es el tema del Capítulo 9.

Transcripción en bacterias

Como en la mayoría de las áreas de la biología molecular, el estudio de *E. coli* ha proporcionado el modelo para posteriores investigaciones acerca de la transcripción en eucariotas. El ARNm fue descubierto en primer lugar en la *E.coli*, como fue expuesto en el Capítulo 4. También fue *E. coli* el primer organismo del que se aisló y purificó la ARN polimerasa. A partir de experimentos en *E. coli* fueron aclarados los mecanismos básicos por los que se regula la transcripción. En estos ensayos se observó que la regulación de la

expresión génica posibilita al organismo a responder a cambios en su entorno, como variaciones en la disponibilidad de nutrientes. La comprensión de la transcripción en *E. coli* ha supuesto la base para los estudios acerca de los mecanismos que regulan la expresión génica en eucariotas, de mucha mayor complejidad.

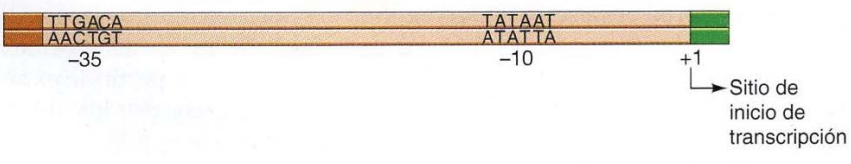
ARN polimerasa y transcripción

La principal enzima responsable de la síntesis de ARN es la **ARN polimerasa**, que cataliza la polimerización de ribonucleósidos trifosfato (NTP) dirigida por un molde de ADN. La síntesis de ARN es similar a la de ADN, y como la ADN polimerasa, la ARN polimerasa cataliza el crecimiento de la cadena de ARN en dirección 5′-3′. Sin embargo, a diferencia de la ADN polimerasa, la ARN polimerasa no requiere un cebador preformado para iniciar la síntesis de ARN. En lugar de ello, la transcripción empieza *de novo* en secuencias específicas al principio de los genes. El proceso de iniciación es especialmente importante porque es el primer paso que regula la transcripción.

La ARN polimerasa, como la ADN polimerasa, es una enzima compleja compuesta de múltiples cadenas polipeptídicas. La enzima intacta se compone de cuatro tipos distintos de subunidades, denominadas α, β, β′, ω y σ (**Fig. 8.1**). La subunidad σ está unida de forma relativamente débil y puede separarse de las otras subunidades, generando un núcleo de la polimerasa que consiste en dos subunidades α, una β, una β′, y una ω. El núcleo de la polimerasa es totalmente capaz de catalizar la incorporación de NTP al ARN, lo cual implica que la subunidad σ no es necesaria para la actividad catalítica básica de la enzima. Sin embargo, el núcleo de la polimerasa no se une específicamente a las secuencias que señalizan la iniciación normal de la transcripción; por tanto, la subunidad σ es necesaria para identificar los lugares adecuados para iniciar la transcripción. La selección de estos sitios es un elemento crítico en la transcripción, porque la síntesis de un ARN funcionante debe comenzar al principio del gen. La mayoría de las bacterias, como *E. coli*, poseen diferentes subunidades σ que dirigen a la ARN polimerasa hacia distintos tipos de sitios de inicio de la transcripción en función de las condiciones imperantes; por ejemplo, en condiciones de inanición o en condiciones de disponibilidad de nutrientes.

La secuencia de ADN a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen se denomina **promotor**. Las secuencias de ADN cuya función es actuar de promotores fueron identificadas en primer lugar en *E.coli* comparando las secuencias nucleotídicas de una serie de genes aislados. Esta comparación reveló que en la región corriente arriba (5′) del sitio de iniciación de la transcripción existen dos tramos de secuencias que son similares en muchos genes. Estas regiones comunes abarcan seis nucleótidos cada una, y se encuentran aproximadamente a 10 y 35 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (**Fig. 8.2**). Se conocen como secuencias –10 y –35, indicando su posición relativa respecto al sitio de inicio de la transcripción, que se define como el sitio +1. Las secuencias –10 y –35 de distintos promotores no son idénticas, pero tienen una similitud suficiente para establecer secuencias de consenso —las bases más frecuentemente encontradas en cada posición.

Diversas fuentes de evidencia experimental han puesto de manifiesto la importancia funcional de las secuencias promotoras –10 y –35. En primer



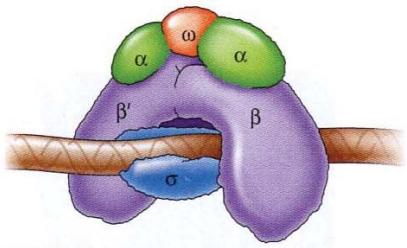


FIGURA 8.1 ARN polimerasa de *E. coli*. La enzima completa consta de seis subunidades: dos α, una β, una β′, una ω y una σ. La subunidad σ está unida de forma relativamente débil y puede disociarse de las otras cuatro subunidades, que constituyen el núcleo de la polimerasa.

ANIMACIÓN 8.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a8.1

Transcripción. La transcripción es la síntesis de ARN dirigida por el ADN, catalizada por la enzima ARN polimerasa.

FIGURA 8.2 Secuencias de los promotores de *E. coli*. Los promotores de *E. coli* se componen de dos grupos de secuencias localizadas a 10 y 35 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de transcripción (+1). Las secuencias consenso representadas son las bases más frecuentemente encontradas en diferentes promotores.

lugar, los genes con promotores que difieren las secuencias consenso son transcritos de una forma menos eficiente que aquellos genes cuyos promotores se asemejan más a las secuencias consenso. Además, el análisis directo de las zonas en las que la ARN-polimerasa se une a los promotores ha demostrado que la polimerasa se une habitualmente a una región de 60 pares de bases, aproximadamente, que se extiende de –40 a +20 (es decir, desde 40 nucleótidos por encima hasta 20 nucleótidos por debajo del punto de inicio de la transcripción). La subunidad σ se une específicamente a las secuencias de las regiones promotoras –35 y –10, corroborando la importancia de estas secuencias en la función de los promotores de la transcripción. Algunos promotores de *E. coli* poseen una tercera secuencia, corriente arriba de la región –35, a la que se une la subunidad α de la ARN polimerasa.

En ausencia de la subunidad σ, la ARN polimerasa se une al ADN de forma no específica y con baja afinidad. La función de σ es dirigir a la polimerasa a los promotores uniéndose específicamente a las secuencias –35 y –10, para iniciar la transcripción en el principio del gen (**Fig. 8.3**). El conjunto formado inicialmente entre la polimerasa y el promotor se denomina complejo promotor cerrado dado que el ADN no está desenrollado. La polimerasa después desenrolla unas 12-14 bases de ADN alrededor del sitio de inicio para dar un complejo promotor abierto en el que ya está disponible una hebra única de ADN para servir como molde para su transcripción, la cual comienza con la incorporación de dos NTP. Tras la adición de unos diez nucleótidos la subunidad σ se separa de la polimerasa, que abandona la secuencia promotora y progresa sobre el molde de ADN para continuar la elongación de la cadena de ARN.

VÍDEO 8.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v8.1

Transcripción de ADN. Durante la transcripción, el ADN se cataliza por la polimerización del ARN, que produce una cadena complementaria de ARN.

Durante la elongación, la polimerasa permanece asociada con su molde mientras continúa la síntesis de ARNm. A medida que avanza, la polimerasa desenrolla el molde de ADN que tiene por delante y vuelve a enrollar el ADN que queda detrás, manteniendo una región desenrollada de unos 15 pares de bases en la región de transcripción. En el interior de esta porción desenrollada de ADN, 8-9 bases de la cadena creciente de ARN se encuentran unidas a la hebra de ADN molde complementaria. El análisis estructural de alta resolución de la ARN polimerasa bacteriana indica que las subunidades β y β′ forman una estructura en forma de pinza de cangrejo que sujeta el molde de ADN (**Fig. 8.4**). Un canal interno entre las subunidades β y β′ acomoda aproximadamente 20 pares de bases de ADN y contiene el centro activo de la polimerasa donde ocurre la síntesis de ARN.

La síntesis de ARN continúa hasta que la polimerasa encuentra una señal de terminación, tras lo cual se detiene la transcripción, se separan el ARN y la polimerasa y la enzima se disocia del molde de ADN. Existen dos mecanismos alternativos para la terminación de la transcripción en *E. coli*. La señal de terminación más simple y común en *E. coli* consiste en una secuencia palindrómica rica en GC seguida de cuatro o más residuos de A (**Fig. 8.5**). La transcripción de la región rica en GC da lugar a un segmento de ARN que forma una horquilla estable por apareamiento complementario de bases. La formación de una estructura autocomplementaria en el ARN altera su unión con el molde de ADN y finaliza la transcripción. Dado que los enlaces A-U son más débiles que los G-C, se cree que la presencia de residuos A corriente abajo de la secuencia palindrómica facilita la disociación del ARN del molde. Alternativamente, la transcripción de algunos genes se termina mediante una proteína específica de terminación (denominada Rho), que se une a los segmentos extendidos (mayores de 60 nucleótidos) de ARN de hebra sencilla. Puesto que los ARNm de bacterias se asocian con ribosomas y son traducidos mientras que son transcritos, dichas regiones extendidas de ARN de hebra sencilla están expuestas sólo en el extremo de un ARNm.

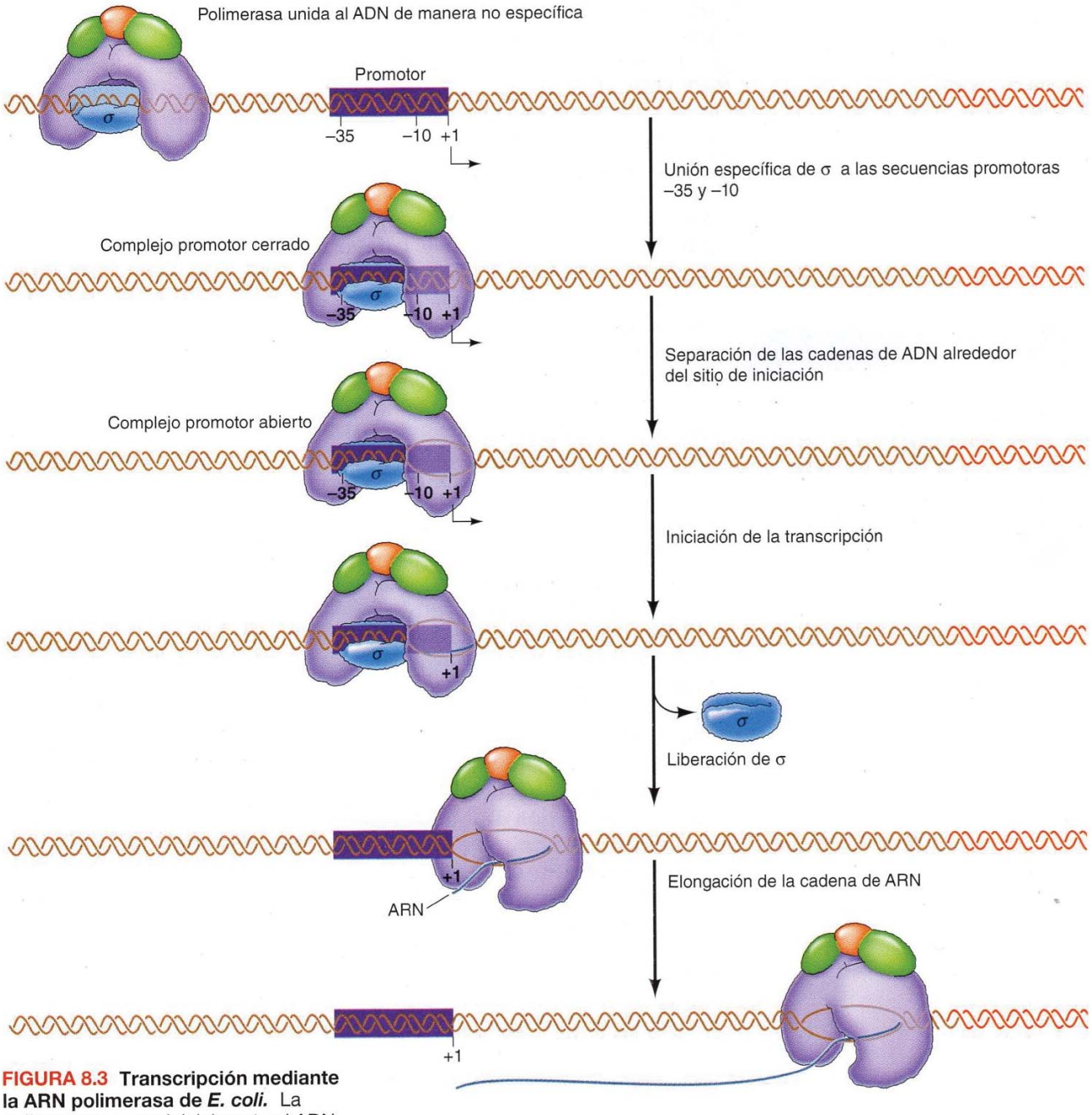


FIGURA 8.3 Transcripción mediante la ARN polimerasa de *E. coli*. La polimerasa se une inicialmente al ADN de forma no específica y recorre la molécula hasta que la subunidad σ se une a los promotores –35 y –10, dando lugar a un complejo promotor cerrado. Entonces la polimerasa va separando las dos cadenas de ADN alrededor del sitio de iniciación, formar un complejo promotor abierto, y comienza la transcripción mediante la polimerización de los NTP libres. La subunidad σ se separa del núcleo de la polimerasa, que se desplaza a lo largo del ADN y va alargando la cadena de ARN en crecimiento.

Control negativo de la transcripción y represores

La transcripción puede regularse en los estadios de iniciación y elongación, pero la mayoría de la regulación transcripcional en bacterias opera al nivel de iniciación. Los estudios pioneros sobre regulación génica en *E. coli* fueron llevados a cabo por François Jacob y Jacques Monod en los años 50. Estos investigadores y sus colaboradores analizaron la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa, que es una fuente de carbonos y energía tras ser hidrolizada a galactosa y glucosa (**Fig. 8.6**). La enzima que cataliza esta reacción (β-galactosidasa) y otras enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa están presentes únicamente cuando existe lactosa en el medio. En caso contrario la bacteria es capaz de econo-

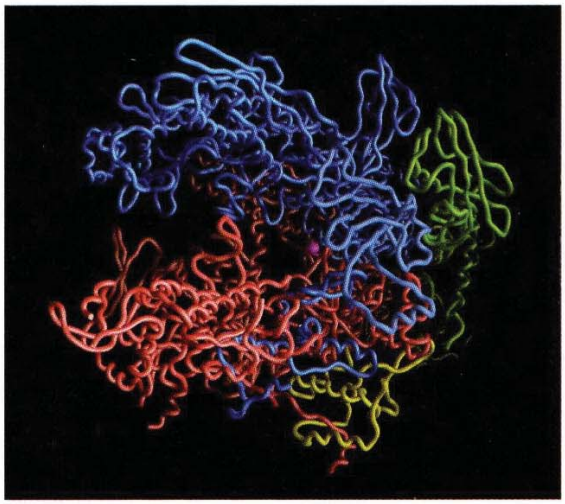


FIGURA 8.4 Estructura de la ARN polimerasa bacteriana. La subunidad α de la polimerasa aparece de color verde, con β en azul, β′ en rosa y ω en amarillo. (Cortesía de Seth Darst, Rockefeller University.)

mizar no invirtiendo energía en la síntesis innecesaria de ARN y proteínas. Por tanto, la lactosa induce la síntesis de las enzimas implicadas en su metabolismo. En el metabolismo de la lactosa intervienen otras dos enzimas cuyos genes se encuentran muy ligados al de la β-galactosidasa: son la galactósido permeasa, que transporta lactosa al interior de la célula, y una transacetilasa, cuya función en esta vía metabólica todavía se desconoce.

Basándose en experimentos puramente genéticos, Jacob y Monod dedujeron el mecanismo de regulación de estos genes, formulando un modelo que sigue vigente para el entendimiento de la regulación transcripcional. Los genes que codifican la β-galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa,

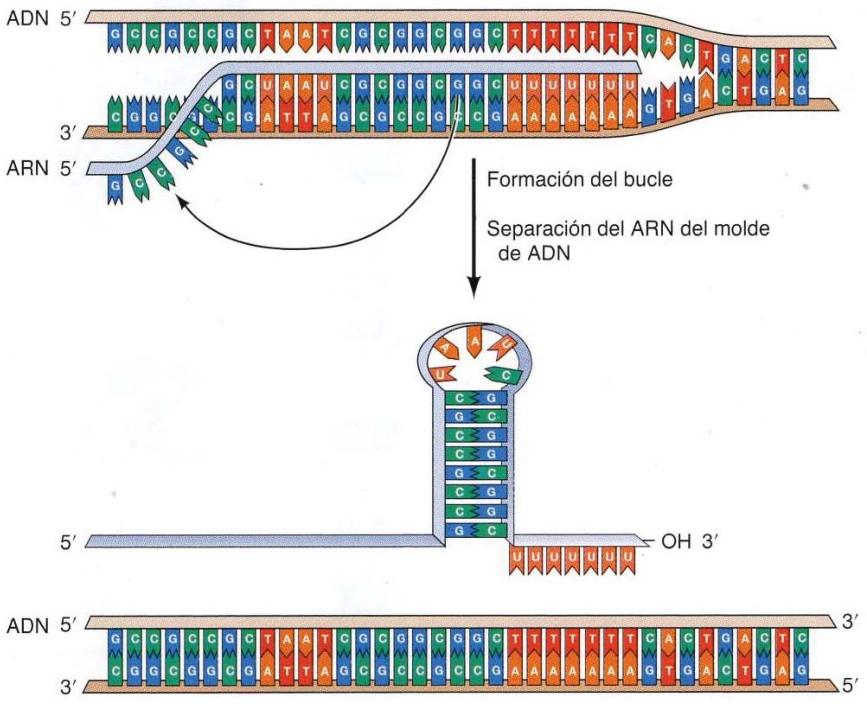
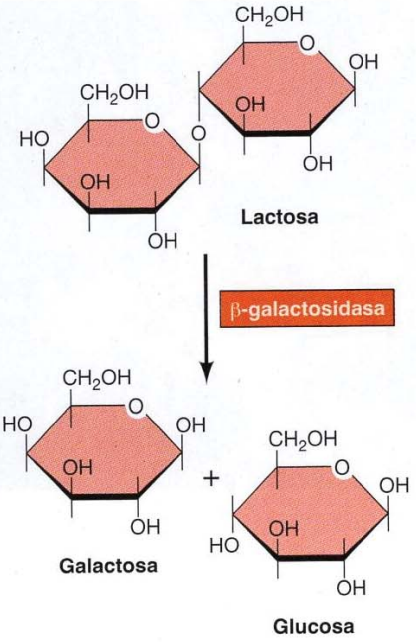


FIGURA 8.5 Terminación de la transcripción. La terminación de la transcripción está señalada por una repetición invertida rica en G-C seguida de cuatro residuos A. La repetición invertida forma una estructura tallo-bucle estable en la transcripción del ARN y que conduce a la separación del ARN a partir del molde de ADN.

FIGURA 8.6 Metabolismo de la lactosa. La β-galactosidasa cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa.



se expresan en una unidad única, denominada un **operón** (**Fig. 8.7**). El estudio de mutantes con una regulación defectuosa de estos genes hizo posible la identificación de dos loci distintos, denominados *o* e *i*, que controlaban la expresión del operón. El locus *o* (el **operador**), situado junto al sitio de inicio de la transcripción, controla la transcripción del operón. El gen *i*, que no se encuentra dentro del operón, codifica una proteína que regula la transcripción al unirse al ADN del operador. Cabe destacar que los mutantes que no sintetizan un producto funcional del gen *i* se caracterizan por la expresión constitutiva del operón incluso en ausencia de lactosa. Este dato señala que el producto normal del gen *i* actuaría como un **represor** que inhibiría la transcripción al unirse a *o*. La adición de lactosa supone la inducción del operón y como consecuencia la alolactosa (un metabolito de la lactosa) se une al represor, lo que impediría su asociación con el ADN del operador.

Se obtuvo confirmación experimental de este modelo a partir de una serie de ensayos, entre los que destaca el aislamiento en los años 60 por Walter Gilbert del represor *lac* y el análisis de su unión al operador en el ADN, definido como una zona de unos 20 pares de bases situada poco antes del sitio de inicio de transcripción. Los análisis por medio de la técnica del *footprinting* han identificado esta región como el sitio de unión del represor, que bloquea la transcripción.

El principio central de regulación génica ejemplificado por el operón lactosa es que el control de la transcripción está mediado por la interacción de proteínas reguladoras con secuencias de ADN específicas. Este modo de regulación es aplicable de forma general a células procariotas y eucariotas. Las secuencias reguladoras del tipo del operador se denominan **elementos de control de acción en *cis***, dado que afectan únicamente a la expresión de genes presentes en la misma molécula de ADN. Por otro lado, las proteínas del tipo del represor se denominan **factores de acción en *trans***, dado que intervienen en la expresión de genes localizados en otros cromosomas de la célula. Por otra parte, ciertas proteínas, como el represor, son capaces de afectar a la expresión de genes situados en otros cromosomas de la célula. El operón *lac* es un ejemplo de control negativo porque la unión del re-

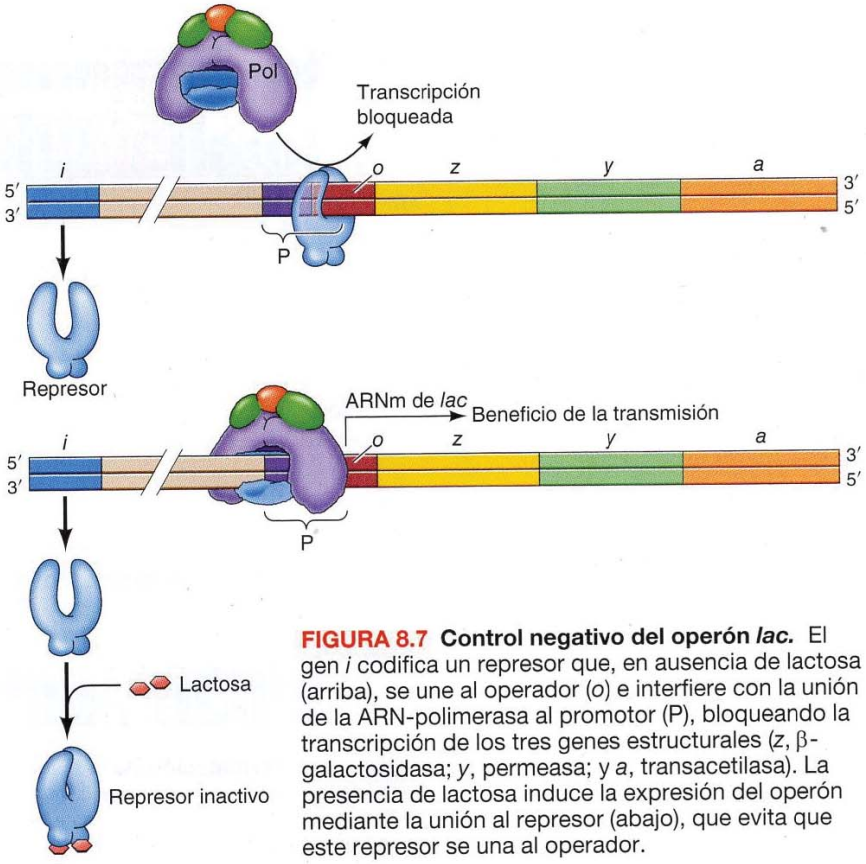


FIGURA 8.7 Control negativo del operón *lac*. El gen *i* codifica un represor que, en ausencia de lactosa (arriba), se une al operador (*o*) e interfiere con la unión de la ARN-polimerasa al promotor (P), bloqueando la transcripción de los tres genes estructurales (*z*, β-galactosidasa; *y*, permeasa; y *a*, transacetilasa). La presencia de lactosa induce la expresión del operón mediante la unión al represor (abajo), que evita que este represor se una al operador.

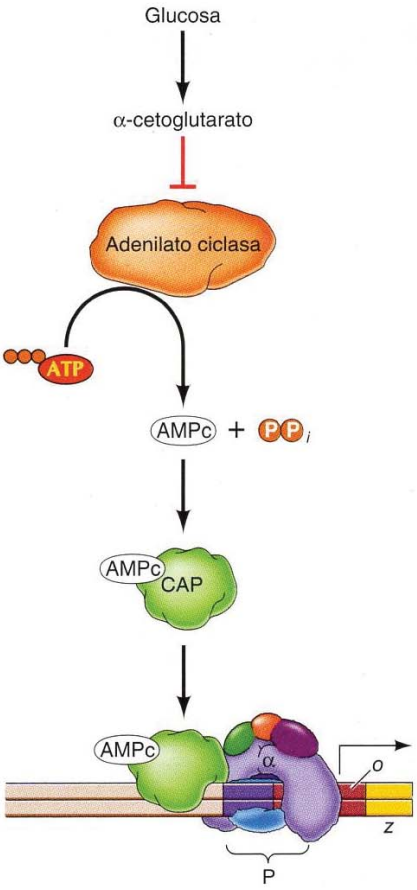


FIGURA 8.8 Control positivo del operón *lac* por la glucosa. La glucosa se metaboliza en α-cetoglutarato, que inhibe la adenilil-ciclasa, la enzima que convierte ATP en AMP cíclico (AMPc). No obstante, si la glucosa es baja, el AMP cíclico se une a la proteína activadora de genes catabólicos (CAP) y estimula su unión con secuencias reguladoras de diversos operones relacionados con el metabolismo de azúcares alternativos, como la lactosa. La CAP interacciona con la subunidad α de la ARN-polimerasa para facilitar la unión de la polimerasa con su promotor (P).

presor bloquea la transcripción. Sin embargo, no siempre ocurre así; existen también muchos casos de control positivo en los que las proteínas reguladoras actúan como activadores, y no como inhibidores de la transcripción.

Control positivo de la transcripción

El ejemplo mejor estudiado de control positivo en *E. coli* es el efecto de la glucosa en la expresión de genes que codifican las enzimas implicadas en el catabolismo de otros azúcares (incluyendo a la lactosa) utilizados como fuente alternativa de carbono y energía. La glucosa se utiliza de forma preferencial, por lo que mientras está disponible, no se expresan las enzimas implicadas en el catabolismo de fuentes alternativas de energía. Por ejemplo, si se cultiva *E. coli* en un medio que contenga glucosa y lactosa, el operón *lac* no se induce y la bacteria solamente utiliza glucosa. Por tanto, la glucosa reprime el operón *lac* incluso en presencia del inductor normal (lactosa).

Actualmente se sabe que la represión por glucosa (denominada represión catabólica o represión por catabolito) está mediada por un sistema de control positivo que depende de los niveles de AMP cíclico (AMPc) (**Fig. 8.8**). La enzima adenilato ciclasa, que transforma ATP a AMPc, inhibido por α-cetoglutarato, un producto intermedio en la descomposición de la glucosa por medio del ciclo del ácido cítrico (véase Fig. 3.4). Cuando se dispone de glucosa, se produce α-cetoglutarato y se inhibe la adenilil-ciclasa. Sin embargo, en ausencia de glucosa o de otras fuentes de uso eficaz de carbono y energía, los niveles de α-cetoglutarato disminuyen, lo que conduce a la activación de la adenilil-ciclasa y a la síntesis de AMPc. El AMPc se une a una proteína de regulación transcripcional denominada proteína activadora de genes catabólicos (CAP), lo cual promueve la unión de CAP a una determinada secuencia de ADN, que en el operón *lac* está situada aproximadamente 60 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente CAP interacciona con la subunidad α de la ARN polimerasa, facilitando la unión de la polimerasa al promotor y activando la transcripción.

ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales

Pese a que la transcripción se lleva a cabo siguiendo una serie de mecanismos comunes en todas las células, es considerablemente más complejo en células eucarióticas que en bacterias. Esto se refleja en dos diferencias entre los sistemas bacterianos y eucariótico. Primero, mientras que en bacterias todos los genes se transcriben por medio de una ARN polimerasa única, las células eucarióticas contienen varias ARN polimerasas diferentes que transcriben distintas clases de genes. En segundo lugar, las ARN polimerasas eucarióticas interaccionan con un conjunto de proteínas específicas para iniciar la transcripción. Finalmente, la transcripción en eucariotas tiene lugar sobre la cromatina en lugar de sobre ADN libre, y la regulación de la estructura cromatínica es un factor importante en la actividad transcripcional de los genes eucariotas. La mayor complejidad de la transcripción eucariótica posibilita la sutileza en la regulación de la expresión génica necesaria para dirigir las actividades de los distintos tipos celulares en organismos multicelulares.

ARN polimerasas eucarióticas

Las células eucarióticas contienen tres tipos de ARN polimerasas nucleares que transcriben distintos tipos de genes (**Tabla 8.1**). Los genes codificadores

de proteínas son transcritos por la ARN polimerasa II para dar ARNm. De igual modo, la ARN polimerasa II se encarga de transcribir moléculas de microARN (ARNmi) y ARN largos no codificantes (ARNlnc) que desempeñan un papel clave en la regulación de la expresión génica en las células eucarióticas. Los ARN ribosómicos (ARNr) y de transferencia (ARNt) se obtienen por medio de las ARN polimerasas I y III. La ARN polimerasa I está específicamente dirigida a la transcripción de las tres moléculas de mayor tamaño de ARNr, designadas 28S, 18S y 5,8S de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación durante la centrifugación. La ARN polimerasa III transcribe los genes codificantes de los ARNt y de las especies más pequeñas de ARNr (5S). Algunos de los ARN pequeños implicados en el empalme y en el transporte de proteínas (ARNsn y ARNsc) también son transcritos por la ARN polimerasa III, mientras que otros son productos de la ARN polimerasa II. Adicionalmente existen ARN polimerasas distintas (similares a las ARN polimerasas bacterianas) en el interior de los cloroplastos y las mitocondrias, donde transcriben de forma específica el ADN de estas organelas.

TABLA 8.1 Tipos de genes transcritos por ARN polimerasas eucarióticas

Tipos de ARN sintetizados	ARN polimerasa
Genes nucleares	
ARNm	II
ARNmi	II
ARNinc	II
ARNt	III
ARNr	
5,8S, 18S, 28S	I
5S	III
ARNsn y ARNsc	II y III[a]
Genes mitocondriales	Mitocondriales[b]
Genes cloroplasmáticos	Cloroplásticos[b]

[a] Algunos ARN nucleares pequeños (sn) y citoplásmicos (sc) se transcriben por la polimerasa II y otros por la polimerasa III.
[b] Las ARN polimeras mitocondriales y de cloroplastos son similares a las enzimas bacterianas.

Las tres ARN polimerasas nucleares son enzimas complejas, que se componen de 12 a 17 subunidades cada una. Pese a que reconocen distintos promotores y transcriben distintas clases de genes, comparten muchas características comunes entre ellas, además de con la ARN polimerasa bacteriana. En concreto, las tres ARN polimerasas eucarióticas contienen nueve subunidades conservadas, cinco de las cuales están relacionadas con las subunidades α, β, β' y ω de la ARN polimerasa bacteriana. La estructura de la ARN polimerasa II de levaduras es muy similar a la de la enzima bacteriana (**Fig. 8.9**), sugiriendo que todas las ARN polimerasas emplean mecanismos fundamentalmente conservados para transcribir el ADN.

Factores de transcripción generales e iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II

Dado que la ARN polimerasa II es responsable de la síntesis de ARNm a partir de los genes codificantes de proteínas, ha sido el objetivo de la mayoría de los estudios de transcripción en eucariotas. Los estudios iniciales de esta enzima indicaron que su funcionamiento es diferente de la ARN polimerasa bacteriana. En sistemas eucarióticos no es posible obtener la transcripción fidedigna de genes bacterianos conseguida *in vitro* con la simple adición de ARN polimerasa purificada a un ADN portador de un promotor. El fundamento de esta diferencia fue elucidado en 1979, cuando Robert Roeder y sus colaboradores descubrieron que la ARN polimerasa II solo es capaz de iniciar la trans-

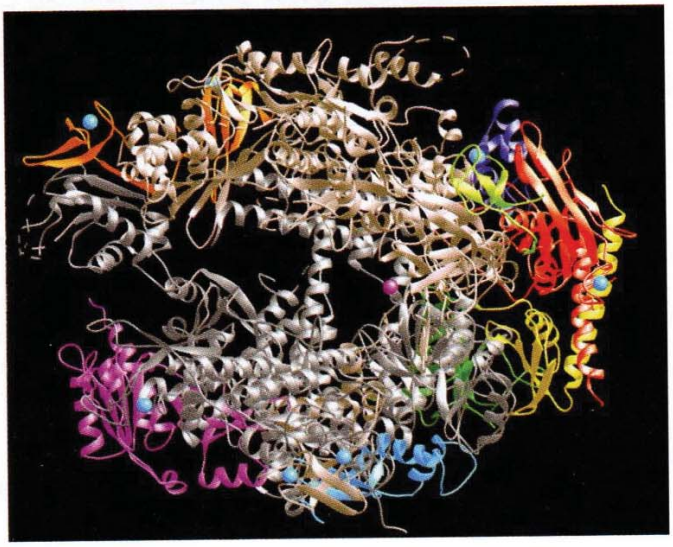


FIGURA 8.9 Estructura de la ARN polimerasa II de levaduras. Las subunidades individuales se diferencian por colores. (De P. D. Kramer y cols., 2001. *Science* 292:1863.)

cripción si se añaden proteínas adicionales a la reacción. Por tanto, la transcripción en sistemas eucarióticos precisa de distintos factores de iniciación que (en contraste con la subunidad σ) no forman parte de la polimerasa.

El fraccionamiento bioquímico de extractos nucleares ha llevado a la identificación de proteínas específicas (denominadas **factores de transcripción**) que son necesarias para que la ARN polimerasa II inicie la transcripción. Han sido definidos dos tipos de factores de transcripción. Los **factores de transcripción generales** están implicados en la transcripción en todos los promotores de la polimerasa II y se consideran entonces parte de la maquinaria transcripcional básica. Otros factores transcripcionales (discutidos más adelante en este capítulo) se unen a secuencias de ADN que controlan la expresión de genes individuales y son, por tanto, responsables de regular la expresión génica. Se estima que aproximadamente el 10% de los genes del genoma humano codifica factores de transcripción, lo que resalta la importancia de estas proteínas.

Los promotores de los genes transcritos por la polimerasa II contienen varias secuencias diferentes junto a los sitios de transcripción (**Fig. 8.10**). El primer elemento descrito de este grupo era una secuencia semejante a TATAA situada a unos 25-30 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Esta secuencia (denominada **caja TATA**) se parece a la secuencia –10 de los promotores *E. coli* y en un primer momento se consideró una característica general de los promotores de todos los genes transcritos por la polimerasa II. No obstante, en los trabajos genómicos más modernos se ha constatado que las secuencias TATA solamente aparecen en el 10%-20% de los promotores de la ARN polimerasa II. Otras secuencias presentes en los promotores de genes transcritos por esta polimerasa son el elemento iniciador (Inr), que abarca el sitio de inicio de la trancripción, los elementos de reconocimiento TFIIB (BRE), localizados corriente arriba de los sitios de inicio de la transcripción, y varios elementos promotores localizados corriente debajo de los sitios de inicio de la transcripción (DPE, DCE y MTE). Los promotores de genes distintos contienen combinaciones diferentes de estos elementos promotores centrales que parecen funcionar de manera conjunta para unirse a factores generales de transcripción.

Se requieren cinco factores generales de transcripción para poner en marcha la transcripción por la ARN polimerasa II en sistemas reconstituidos *in vitro* (véase Fig. 8.10). El primer paso en la formación de un complejo de transcripción consiste en la unión de un factor general de transcripción denominado TFIID al promotor (TF indica factor de transcripción; II indica polimerasa II). TDFIID se compone de varias subunidades, como la **proteína de unión a TATA (TBP)** y otros 13 o 14 polipéptidos, denominados **factores asociados a TBP (TAF)**. TBP se une de manera específica a la caja TATA, mientras que otras subunidades lo hacen a las secuencias Inr, DPE, DPC y MTE. La unión de TFIID se sigue del reclutamiento de un segundo factor general de transcripción (TFIIB), que se une a TBP además de a secuencias BRE. A su vez, TFIIB actúa como puente para la ARN polimerasa que se une al complejo TBP-TFIIB junto a un tercer factor, TFIIF.

Tras el reclutamiento de la ARN polimerasa II por el promotor, se precisa de la unión de otros dos factores adicionales (TFIIE y TFIIH) para completar la formación del complejo de preiniciación. El TFIIH es un factor con múltiples subunidades que parece tener al menos dos importantes funciones. En primer lugar dos de las subunidades de TFIIH son helicasas, que desenrollan el ADN alrededor del sitio de iniciación (estas subunidades de TFIIH son también necesarias para la escisión y reparación de nucleótidos, como fue expuesto en el Cap. 7). Otra subunidad de la TFIIH es una proteína quinasa que fosforila determinadas secuencias repetidas en el dominio C-terminal de la subunidad principal de la ARN polimerasa II. El dominio

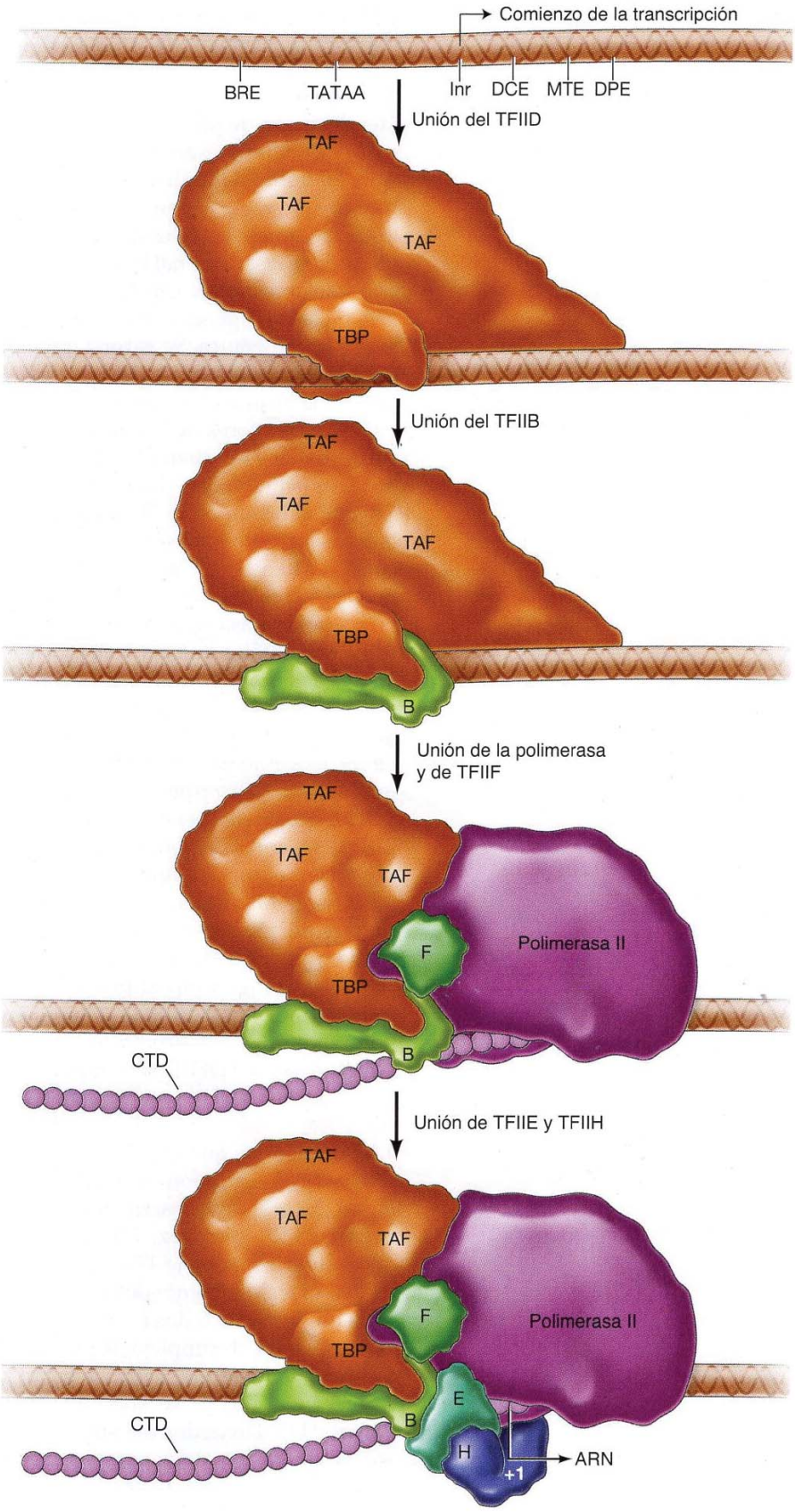


FIGURA 8.10 Formación de un complejo de preiniciación de la polimerasa II *in vitro*. Entre los elementos de secuencia presentes en los promotores de la polimerasa figuran la caja TATA (secuencia consenso TATAA), situada 25 a 30 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), situado unos 35 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, el elemento iniciador (Inr), que abarca el sitio de inicio de la transcripción, y varios elementos localizados corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción (DCE, MTE y DPE). La formación de un complejo de transcripción comienza mediante la unión del factor de transcripción TFIID. Una subunidad de este factor, la proteína de unión a TATA o TBP, se une a la caja TATA; otras subunidades (factores asociados a TBP o TAF) se unen al elemento Inr y elementos de promotores situados corriente abajo. A continuación, TFIIB/B) se une a TBP y a secuencias BRE, lo que se sigue de la elaboración de la unión de la polimerasa asociada a TFIIF(F). Finalmente, las proteínas TFIIF(E) y TFIIF(H) se asocian a este complejo. CTD es el dominio C-terminal de la subunidad de mayor tamaño de la ARN-polimerasa.

C-terminal de la polimerasa II (o CTD) consiste en repeticiones en tándem (26 repeticiones en levaduras y 52 en el hombre) de siete aminoácidos con la secuencia consenso Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. La fosforilación del residuo 5 de serina (el quinto aminoácido) en estas repeticiones CTD por acción de la TFIIH proteinquinasa induce la liberación de la polimerasa del complejo de preiniciación y da lugar al comienzo de la transcripción.

Aunque el reclutamiento de cinco factores de transcripción generales y la ARN polimerasa II descritos aquí representan el sistema mínimo necesario para la transcripción *in vitro*, en el interior celular se requieren factores adicionales. Estos factores incluyen el complejo proteico **Mediador** que consiste en más de 20 subunidades distintas e interacciona con factores generales de transcripción y la ARN polimerasa (**Fig. 8.11**). El complejo Mediador no solamente estimula la transcripción basal, sino que además desempeña una función clave en la asociación de los factores generales de transcripción con los factores específicos de transcripción de ciertos genes que regulan la expresión génica. Las proteínas Mediadoras se liberan de la polimerasa tras el ensamblaje del complejo de preiniciación y la fosforilación del dominio

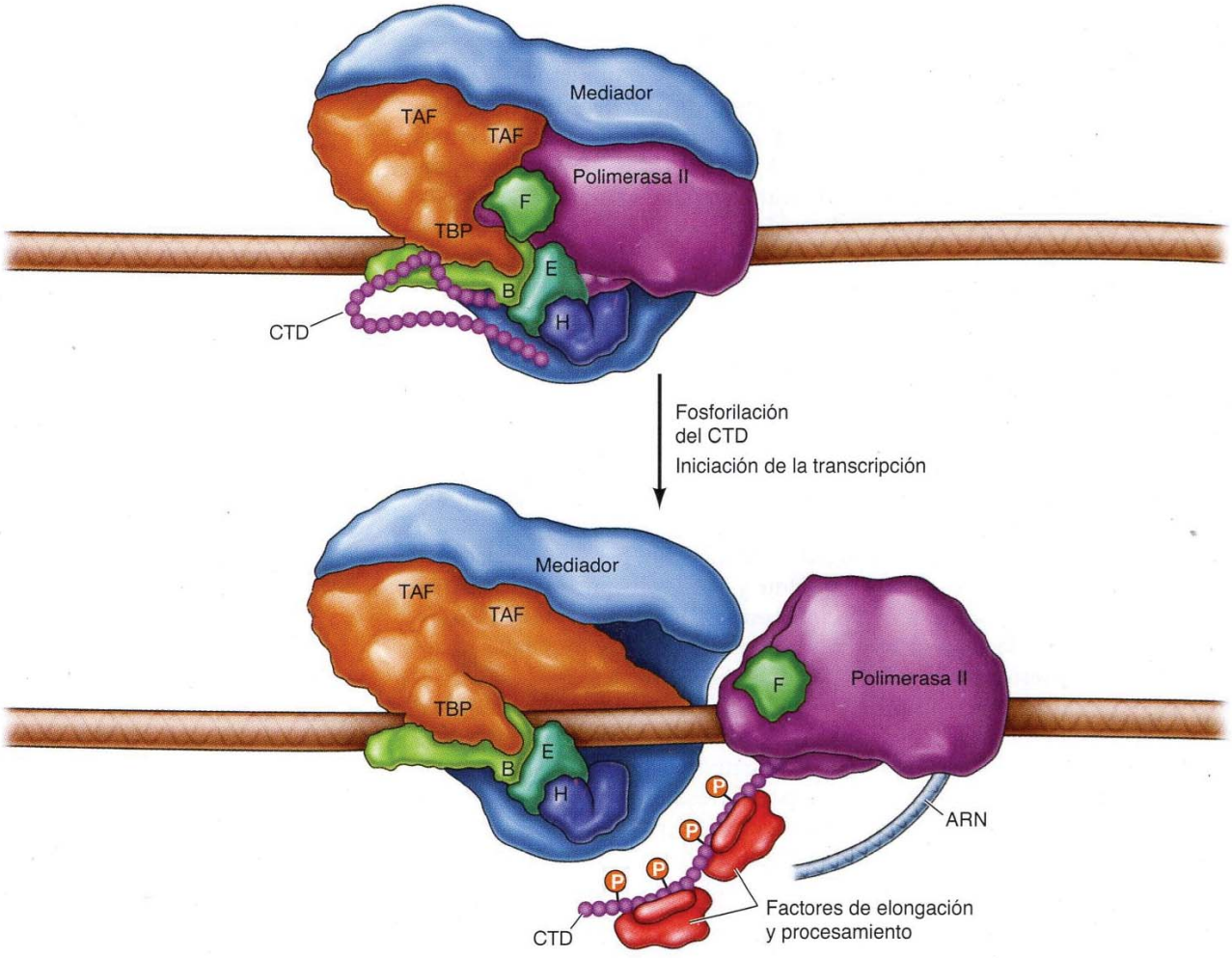


FIGURA 8.11 Complejos de ARN polimerasa II/Mediador y de inicio de la transcripción. La ARN polimerasa II está asociada con proteínas Mediadoras, además de con los factores de transcripción generales, en el promotor (véase Fig. 8.10). El complejo Mediador se une al dominio C-terminal no fosforilado (CTD) de la polimerasa II, y es liberado tras la fosforilación del CTD cuando se inicia la transcripción. A continuación, el CTD fosforilado se une a factores de elongación y de procesamiento que facilitan la síntesis y procesamiento del ARNm.

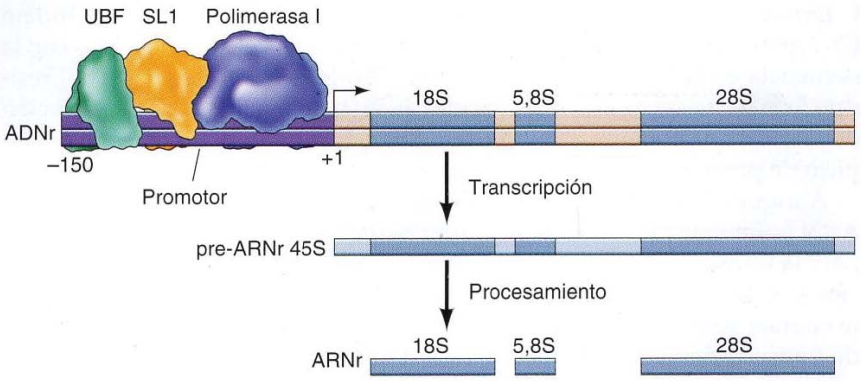


FIGURA 8.12 Gen de ARN ribosómico. ADN ribosómico (ADNr) se transcribe para dar lugar a una molécula de ARN de gran tamaño (pre-ARNr 45S) que posteriormente es dividida en ARNr de 28S, 18S y 5,8S. Dos factores de transcripción, UBF (factor de unión corriente-arriba) y SL1 (factor de selectividad 1), se unen de forma cooperativa al promotor ADNr y reclutan ARN-polimerasa I para formar un complejo de iniciación.

C-terminal. A continuación, el CTD fosforilado se une a otras proteínas que facilitan la elongación transcripcional y que participan en el procesamiento del ARNm, que se aborda en una sección ulterior de este capítulo.

Transcripción por las ARN polimerasas I y III

Como fue expuesto con anterioridad, distintas ARN polimerasas son responsables de la transcripción de los genes que codifican los ARN ribosómicos y de transferencia y algunos pequeños ARN no codificantes en células eucariotas. Al igual que la ARN-polimerasa II, estas otras ARN-polimerasas eucariotas también precisan factores de transcripción adicionales para asociarse a las secuencias promotoras adecuadas.

La ARN polimerasa I se dedica de forma exclusiva a la transcripción de genes de ARN ribosómico, que están presentes en forma de repeticiones en tándem. La transcripción de estos genes da lugar a un pre-ARNr 45S de gran tamaño, que es procesado para dar los ARNr 28S, 18S y 5,8S (**Fig. 8.12**). El promotor de los genes de ARN ribosómico se extiende unos 150 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias promotoras son reconocidas por dos factores de transcripción, el UBF (factor de unión corriente-arriba), y el SL1 (factor de selectividad 1), que se unen de forma cooperativa al promotor y reclutan a la polimerasa I para formar el complejo de iniciación.

Los genes del ARNt, ARN 5S y algunos de los ARN pequeños nucleares (snARNs) implicados en el corte y empalme y en el transporte de proteínas se transcriben por medio de la ARN polimerasa III. Estos genes se transcriben a partir de tres clases de promotores diferentes, dos de los cuales se encuentran en el interior, en lugar de por delante, de la secuencia transcrita (**Fig. 8.13**). El TFIIIA (que ha sido el primer factor de transcripción purificado) inicia el ensamblaje del complejo de transcripción uniéndose a secuencias específicas de ADN en el promotor del gen del ARNr 5S. Esta unión se sigue de la unión de TFIIIC, TFIIIB y la polimerasa. Los promotores de los genes del ARNt (como snARNs) se diferencian del promotor del ARNr 5S en que no contienen la secuencia de ADN reconocida por el TFIIIA (TFIIIC y SNAP, respectivamente). En lugar de ello, el TFIIIC se une directamente a los promotores de los genes del ARNt, y atrae al TFIIIB y la polimerasa para formar un complejo de transcripción. Los promotores de la tercera clase de genes transcritos por la polimerasa III, incluyendo los genes que codifican algunos de los ARN pequeños nucleares implicados en el corte y empalme, se localizan por delante del punto de iniciación de la transcripción. Estos promotores contienen una secuencia TATA (como los promotores de algunos genes de la polimerasa II) además de un punto de unión para otro factor, denominado SNAP. SNAP y TFIIIB se unen cooperativamente a estos

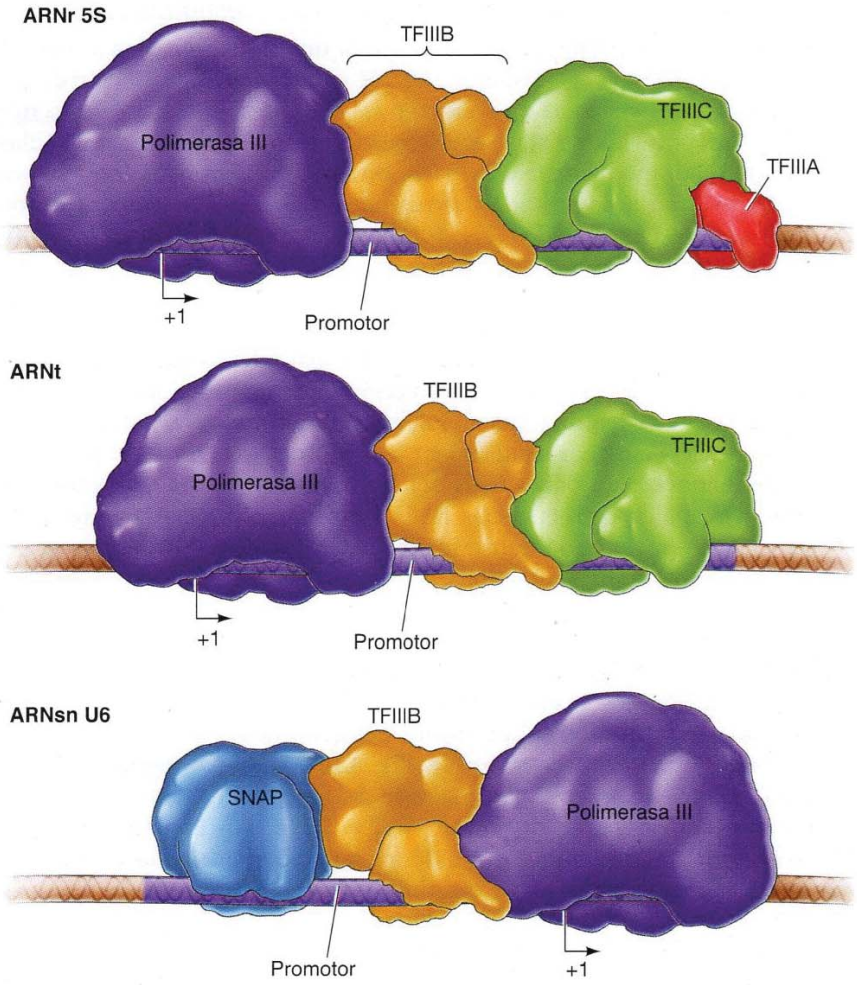


FIGURA 8.13 Transcripción de los genes de la polimerasa III. Los genes transcritos por la polimerasa III se expresan a partir de tres tipos de promotores. Los promotores de los genes del ARNr 5S y ARNt están corriente abajo del sitio de iniciación de la transcripción. La transcripción del gen de ARNr 5S comienza con la unión de TFIIIA, seguido del TFIIIC, TFIIIB y la polimerasa. Los promotores de los genes de ARNt y ARNsn no contienen lugares de unión para TFIIIA, y son reconocidos por otros factores (TFIIIC y SNAP, respectivamente) que reclutan a la TFIIIB y ARN-polimerasa.

promotores, y TFIIIB se une directamente a la secuencia TATA. Esto está mediado por una proteína de unión a TATA, TBP, que es una de las subunidades de TFIIIB. Al igual que en el caso de los promotores de otros genes de la ARN polimerasa III, a continuación TFIIIB recluta a la polimerasa al complejo transcripcional.

Regulación de la transcripción en eucariotas

Pese a que el control de la expresión génica es mucho más complejo en eucariotas que en bacterias, se aplican los mismos principios básicos. Al igual que ocurre en las bacterias, la transcripción en las células eucarióticas está controlada por proteínas que se unen a secuencias reguladoras específicas y modulan la actividad de la ARN polimerasa. Una diferencia importante entre la regulación transcripcional en bacterias y eucariotas, sin embargo, resulta del empaquetamiento del ADN eucariótico en cromatina, lo que limita su disponibilidad como molde para la transcripción. Como resultado, las modificaciones de la estructura de la cromatina juegan papeles fundamentales en el control de la transcripción en células eucariotas. Un área especialmente interesante de investigación actual está basado en el descubrimiento de que los ARN no codificantes, además de las proteínas, regulan la transcripción en células eucariotas mediante modificaciones de la estructura cromatínica.

Secuencias de regulación en cis: *promotores y estimuladores*

La transcripción en bacterias se regula por la unión de proteínas a secuencias de acción en *cis* (p. ej., el operón *lac*) que controla la transcripción de genes adyacentes. Secuencias de acción en *cis* similares regulan la transcripción de genes eucariotas. Estas secuencias han sido identificadas en células de mamífero por medio de la utilización de ensayos de transferencia génica con el fin de estudiar la actividad de regiones sugerentes de poseer función reguladora en genes clonados (**Fig. 8.14**). Las secuencias de regulación eucarióticas se unen a un gen «reportero» que codifica una enzima fácilmente detectable, como la luciferasa de la luciérnaga (la enzima que produce bioluminiscencia). La expresión del gen reportero tras su transferencia a células en cultivo proporciona un ensayo sensible para determinar la actividad de las secuencias reguladoras en la dirección de la transcripción. Es posible identificar regiones reguladoras biológicamente activas, y se puede utilizar la mutagénesis *in vitro* para determinar la función de secuencias específicas.

Los genes transcritos por la ARN polimerasa II tienen dos elementos promotores principales, las secuencias TATA e Inr, que sirven de sitios de unión específicos para factores de transcripción generales. Otras secuencias de acción en *cis* sirven de sitios de unión para una amplia variedad de factores de regulación que controlan la expresión de genes individuales. Estas secuencias reguladoras en *cis* se localizan algunas veces, pero no constante, corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por ejemplo, dos secuencias de regulación que se encuentran en muchos genes eucarióticos fueron identificadas en estudios del promotor del gen que codifica a la timidina quinasa en el virus del herpes simple (**Fig. 8.15**). Ambas secuencias se localizan a 100 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción: sus secuencias consenso son CCAAT y GGGCGG (llamada secuencia GC, o GC *box*). Actualmente han sido identificadas proteínas específicas que se unen a estas secuencias y estimulan la transcripción.

En contraste con la relativamente simple organización de las secuencias CCAAT y GC en el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes, muchos genes de células eucarióticas están controlados por secuencias de regulación localizadas a mayor distancia (en ocasiones cientos de kilobases) del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias, denominadas **estimuladores** o ***enhancers***, fueron identificadas por primera vez en estudios del promotor de otro virus, el SV40 (**Fig. 8.16**). Además de una secuencia TATA y un conjunto de seis secuencias GC, para llevar a cabo una transcripción eficiente se requieren dos repeticiones de 72 pares de bases localizadas más lejos corriente arriba. Se observó que estas secuencias estimulan la transcripción de otros promotores además del promotor del SV40, y, sorprendentemente, su actividad no depende ni de la distancia ni de su orientación respecto al sitio de inicio de la transcripción (**Fig. 8.17**). Pueden estimular la transcripción situados corriente arriba o abajo del promotor y orientados en cualquiera de los dos sentidos.

La capacidad de los estimuladores de funcionar incluso a distancia de los sitios de iniciación de la transcripción sugirió inicialmente que actúan por un mecanismo distinto al resto de los promotores. Sin embargo, esto no ha

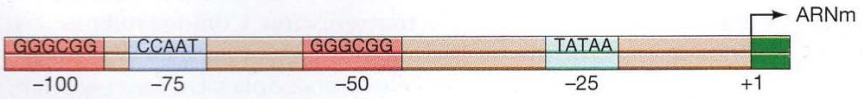


Figura 8.15 Promotor eucariótico. El promotor del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex contiene tres secuencias corriente arriba de la secuencia TATA, necesarias para una transcripción eficaz: dos secuencias GC (secuencia consenso GGGCGG) y una secuencia CCAAT.

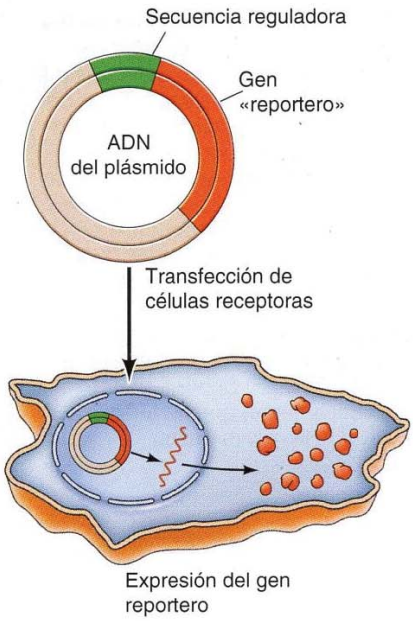


FIGURA 8.14 Identificación de las secuencias reguladoras eucarióticas. Se une la secuencia reguladora de un gen eucariótico clonado a un gen «reportero» que codifica una enzima fácilmente detectable. El plásmido resultante se introduce en células receptoras cultivadas mediante transfección. Una secuencia reguladora activa dirige la transcripción del gen reportero, y su expresión es detectada en las células transfectadas.

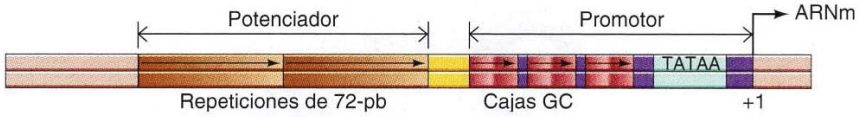


FIGURA 8.16 Estimulador del SV40. El promotor del SV40 para la expresión génica precoz contiene una secuencia TATA y seis secuencias GC organizadas en tres grupos de secuencias repetidas. Además, para una transcripción eficaz se necesita un potenciador situado hacia arriba en la cadena que consta de dos repeticiones de 72 pares de bases (pb).

resultado ser cierto: los intensificadores, como los promotores, actúan ligando factores transcripcionales que regulan posteriormente a la ARN polimerasa. Esto es posible porque el ADN forma bucles, lo que permite que un factor de transcripción unido a un intensificador distante interactúe con proteínas asociadas a factores de transcripción Mediator o generales (p. ej., TFIID) en el promotor (**Fig. 8.18**). La formación de estos bucles de ADN son facilitados por la proteína cohesina, que mantiene la asociación entre cromátidas hermanas tras la replicación del ADN (detallado en el capítulo 16). Los factores de transcripción unidos a estimuladores lejanos pueden por tanto actuar por el mismo mecanismo que los situados adyacentes a los promotores, por lo que no existe ninguna diferencia fundamental entre las acciones de los intensificadores y las de las secuencias reguladoras en *cis* adyacentes a los sitios de inicio de la transcripción. Es interesante reseñar que aunque los *enhancers* fueron inicialmente identificados en eucariotas, han

◆ Los potenciadores o *enhancers* pueden funcionar a través de grandes distancias, a veces incluso desde distintos cromosomas. Este proceso, denominado transvección, ha sido mejor estudiado en *Drosophila* e implica la regulación de la expresión de un gen por parte de secuencias potenciadoras trans-activadoras presentes en su cromosoma homólogo separado.

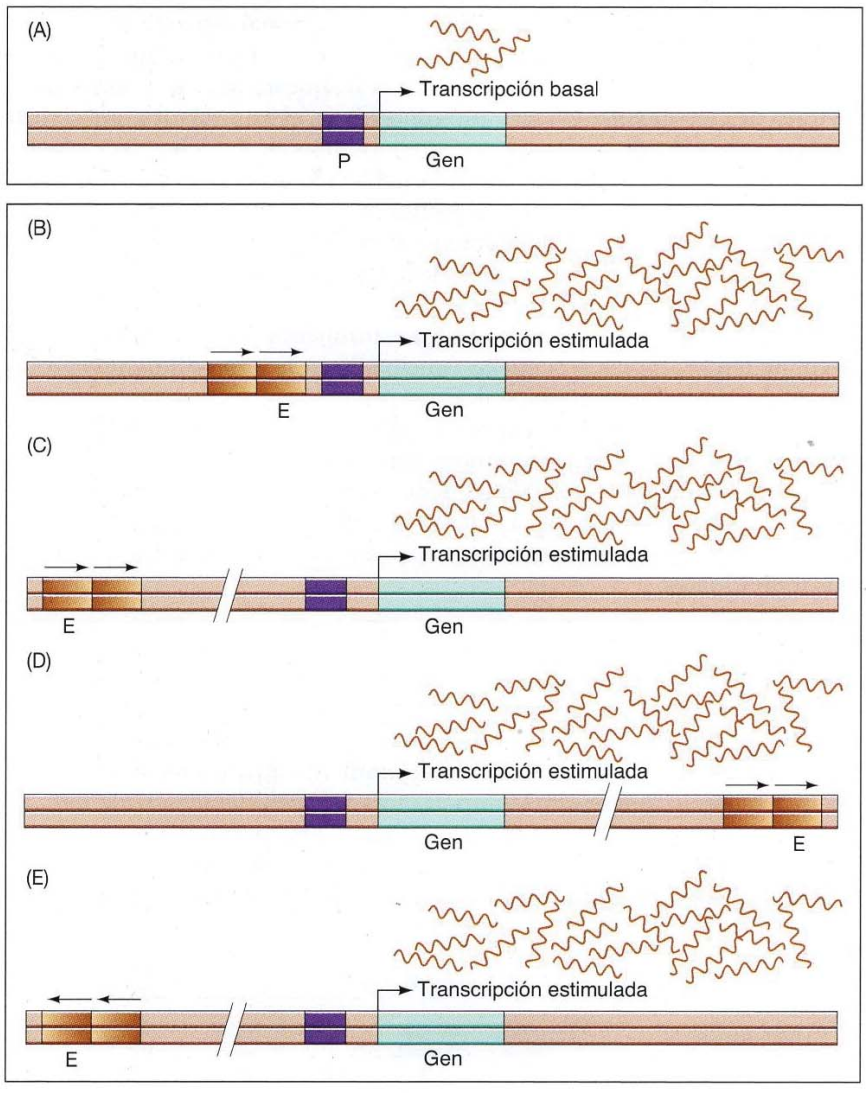


FIGURA 8.17 Actuación de los estimuladores. Sin un estimulador, el gen se transcribe a un nivel basal bajo (A). La adición de un estimulador, E —por ejemplo, las repeticiones de 72 pares de bases del SV40— estimula la transcripción. El estimulador es activo no sólo cuando se coloca en la cadena justo por delante del promotor (B), sino también a varias kilobases hacia arriba o hacia abajo del sitio de inicio de transcripción (C y D). Además, los estimuladores son activos orientados en cualquiera de los dos sentidos (E).

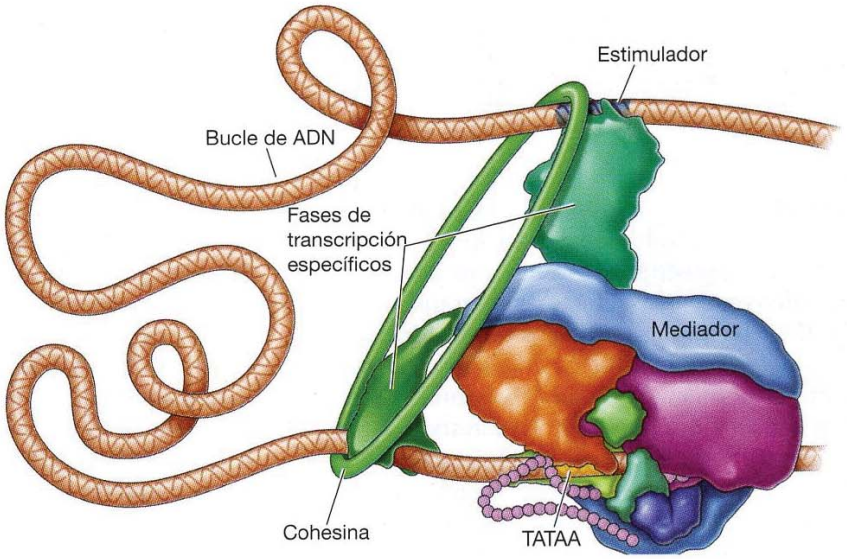


FIGURA 8.18 Formación de bucles en el ADN. Los factores de transcripción unidos a estimuladores lejanos pueden interaccionar con el Mediador o los factores de transcripción generales en el promotor gracias a que el ADN es capaz de formar bucles estabilizados por la cohesina.

sido posteriormente encontrados en bacterias —un caso inusual de aplicación de estudios en eucariotas como modelo para sistemas bacterianos.

La unión de proteínas de regulación transcripcional específicas a los estimuladores es responsable del control de la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación, así como en la respuesta celular a hormonas y factores de crecimiento. Un ejemplo conocido es el estimulador que controla la transcripción de genes de inmunoglobulinas en linfocitos B. Los experimentos de transferencia génica han establecido que el estimulador de las inmunoglobulinas es activo en linfocitos, pero no en otros tipos celulares. Por tanto, esta secuencia reguladora es al menos en parte responsable de la especificidad tisular en la expresión de los genes de inmunoglobulinas en el tipo celular apropiado.

Una característica importante de los estimuladores es que habitualmente contienen múltiples secuencias funcionales que ligan diferentes proteínas de regulación transcripcional. Estas proteínas funcionan de forma conjunta en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, el estimulador de las cadenas pesadas de inmunoglobulina abarca unos 200 pares de bases y contiene al menos nueve secuencias distintas que sirven de sitio de unión a proteínas (**Fig. 8.19**). La actividad global del estimulador refleja la acción combinada de las proteínas asociadas con cada una de sus secuencias individuales.

Los estimuladores pueden identificarse no sólo como puntos de unión para los factores de transcripción, sino también por rasgos característicos de la cromatina, que se abordará más adelante en el capítulo. Los análisis globales basados en estas características han identificado de 500.000 a más de un millón de estimuladores en el genoma humano, lo que supone el 10% o más del ADN genómico total. Existen claramente muchos más estimuladores que genes, lo que resalta la importancia de estos elementos reguladores para determinar el comportamiento biológico. Este punto se refuerza por la observación de que muchas mutaciones ligadas con enfermedades humanas afectan a los estimuladores y no a las secuencias codificantes de proteí-

◆ Un obstáculo importante para la terapia génica es que los genes introducidos a menudo son regulados de forma aberrante o inactivados como consecuencia de la estructura cromatínica cercana. La adición de elementos aisladores es una potencial solución a este problema.

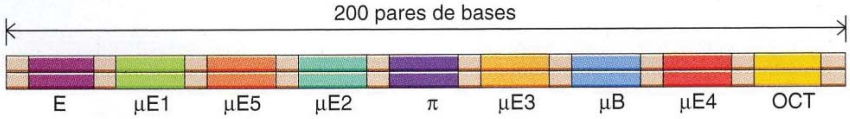


FIGURA 8.19 Estimulador de la inmunoglobulina. El estimulador de la cadena pesada de la inmunoglobulina abarca unas 200 bases y contiene nueve secuencias funcionales (E, μE1-5, π, μB y OCT) que conjuntamente estimulan la transcripción en linfocitos B.

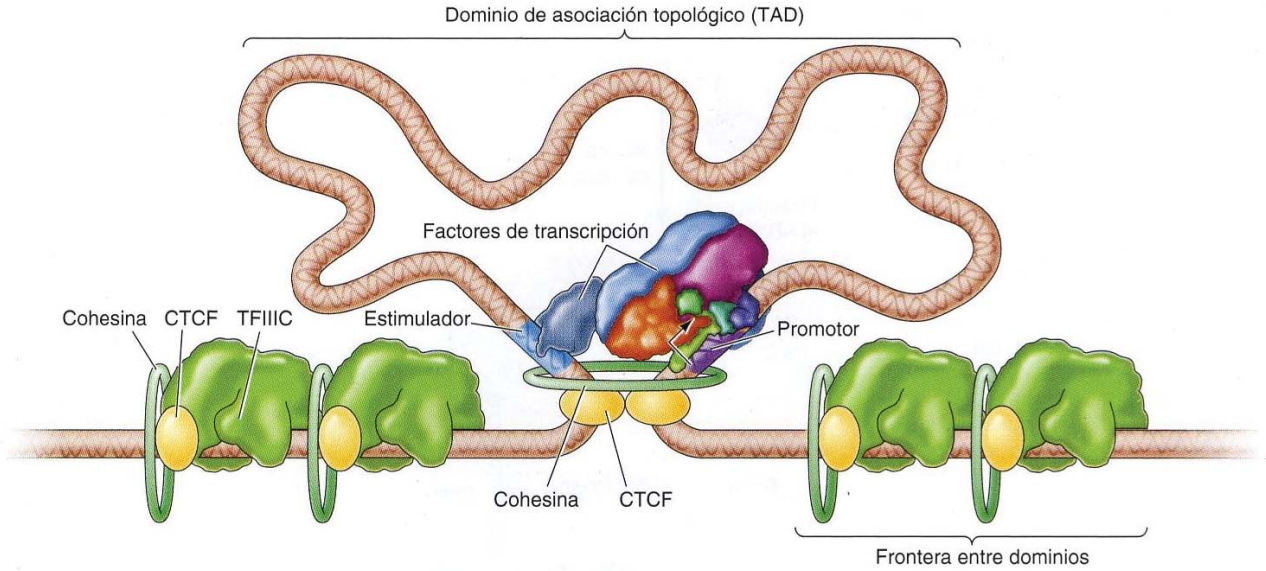


FIGURA 8.20 Dominios cromosómicos y CTCF. Los estimuladores y los promotores dentro de dominios de asociación topológicos (TAD) interaccionan frecuentemente entre sí, pero muy raras veces con elementos de otros dominios. Las fronteras de los TAD contienen múltiples sitios de unión para CTCF y para TFIIIC, que pueden actuar para establecer estas fronteras y limitar los estimuladores. Dentro de un dominio, los CTCF pueden actuar junto con la cohesina para promover la formación de bucles y facilitar las interacciones entre estimuladores y promotores.

nas. En cualquier tipo celular dado, se estima que puede haber del orden de 50.000 estimuladores activos, muchos de los cuales actúan conjuntamente para regular cada gen individual. El programa de regulación génica en los eucariotas superiores es así bastante más complejo de lo que podría sugerir el limitado número de genes codificantes de proteínas en nuestro genoma.

Aunque la formación de bucles de ADN permite que los *enhancers* actúen a una distancia considerable de los promotores, la actividad de cualquier *enhancer* dado es específica para el promotor de su gen diana correspondiente. Esta especificidad se mantiene gracias a los **aisladores**, que inicialmente se caracterizaron como secuencias y no como un dominio diferente. Recientemente se ha producido un avance considerable en la comprensión del modo de actuar de los aisladores y de la naturaleza de la cromatina, con el uso de nuevos métodos (denominados captura de conformación de cromosomas, o 3C) que determinan los puntos de interacción entre diferentes regiones cromosómicas dentro de una célula. Los análisis de estas interacciones indican que los genomas se dividen en una serie de dominios cromosómicos discretos, llamados **dominios de asociación topológicos** o **TAD** (**Fig. 8.20**). Los estimuladores y los promotores de un dominio interaccionan frecuentemente entre sí, pero rara vez con elementos de otros dominios. En los seres humanos, los TAD contienen entre aproximadamente un centenar y varios miles de kilobases.

La principal proteína que se une a los aisladores en los vertebrados es la **CTCF**, que según se ha descubierto tiene un papel fundamental en la arquitectura para la regulación de la organización del genoma (véase Fig. 8.20). Las fronteras de los TAD contienen numerosos puntos de unión para CTCF, que parecen intervenir en el establecimiento de estos dominios y en la limitación de las acciones de los estimuladores. Por el contrario, la CTCF puede actuar junto con la cohesina para promover la formación de bucles y facilitar las interacciones entre estimuladores/promotores con un TAD. Estas distintas acciones de la CTCF pueden depender de sus interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, las fronteras entre los TAD están enriquecidas también con puntos de unión para TFIIIC, que pueden actuar junto con la CTCF y la cohesina para establecer estas fronteras. Dada la importancia de las interacciones de estimuladores/promotores en las células de los mamíferos, comprender la regulación de CTCF y su actuación para coordinar las interacciones cromosómicas de largo alcance se mantiene como un reto estimulante para las futuras investigaciones.

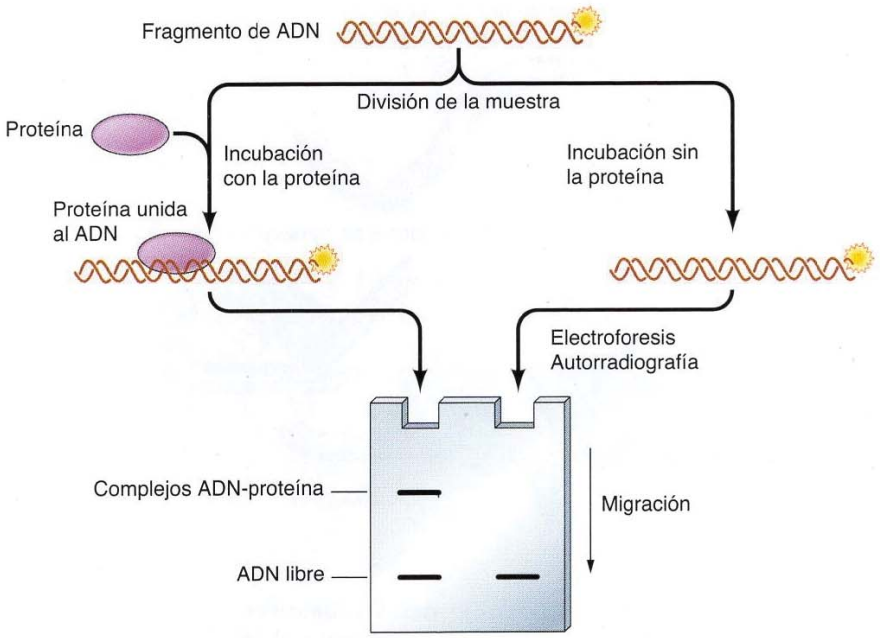


FIGURA 8.21 Test del cambio en la movilidad electroforética. Se divide en dos una muestra que contiene fragmentos de ADN marcados radiactivamente, y una de las mitades es incubada con una proteína que se une a una secuencia determinada de ADN. Las muestras son posteriormente analizadas mediante electroforesis en un gel no desnaturalizante, de forma que la proteína permanezca unida al ADN. La unión de la proteína se detecta gracias a la migración más lenta de los complejos ADN-proteína comparada con la del ADN libre. Realmente sólo una parte del ADN en la muestra está unido a la proteína, por lo que tanto los complejos de ADN-proteína como el ADN libre se detectan por la incubación del ADN con la proteína.

Sitios de unión para factores de transcripción

Los sitios de unión para las proteínas reguladoras transcripcionales en las secuencias promotoras o potenciadoras se han identificado generalmente mediante dos tipos de experimentos. Una técnica frecuente es el **análisis de variación de movilidad electroforética**, en el que un fragmento de ADN radiomarcado se incuba con un preparado proteico, y a continuación se somete a electroforesis en un gel no desnaturalizante (**Fig. 8.21**). La unión a la proteína se detecta en forma de reducción de la movilidad electroforética del fragmento de ADN, porque su migración a través del gel está ralentizada por la proteína unida. El uso combinado del análisis de variación de la movilidad electroforética con la cartografía detallada de las interacciones ADN-proteínas ha llevado a la caracterización de los lugares de unión a factores de transcripción dentro de los intensificadores y promotores de células eucariotas.

Los sitios de unión para la mayoría de los factores de transcripción consisten en secuencias cortas de ADN, típicamente abarcando 6-10 pares de bases. En la mayoría de los casos, estos sitios de unión son degenerados, lo que significa que el factor de transcripción se unirá no sólo a la secuencia consenso sino también a secuencias que difieren del consenso en una o más posiciones. Es, por tanto, común representar los sitios de unión para factores de transcripción como pictogramas, representando la frecuencia de cada base en todas las posiciones de los sitios de unión conocidos para un factor determinado (**Fig. 8.22**). Dada su naturaleza corta degenerada, las secuencias que coinciden con los sitios de unión para factores de transcripción ocurren con frecuencia en el

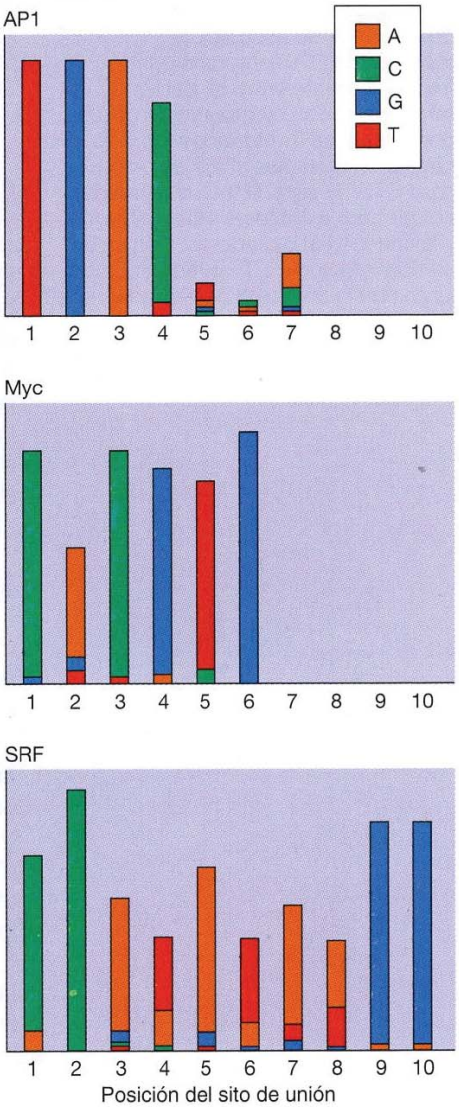


FIGURA 8.22 Sitios de unión de los factores de transcripción representativos. Los sitios de unión de tres factores de transcripción de mamíferos (AP1, Myc y SRF) se muestran como pictogramas en los que la frecuencia de cada nucleótido está representada por la altura de la letra correspondiente en cada posición del sitio de unión.

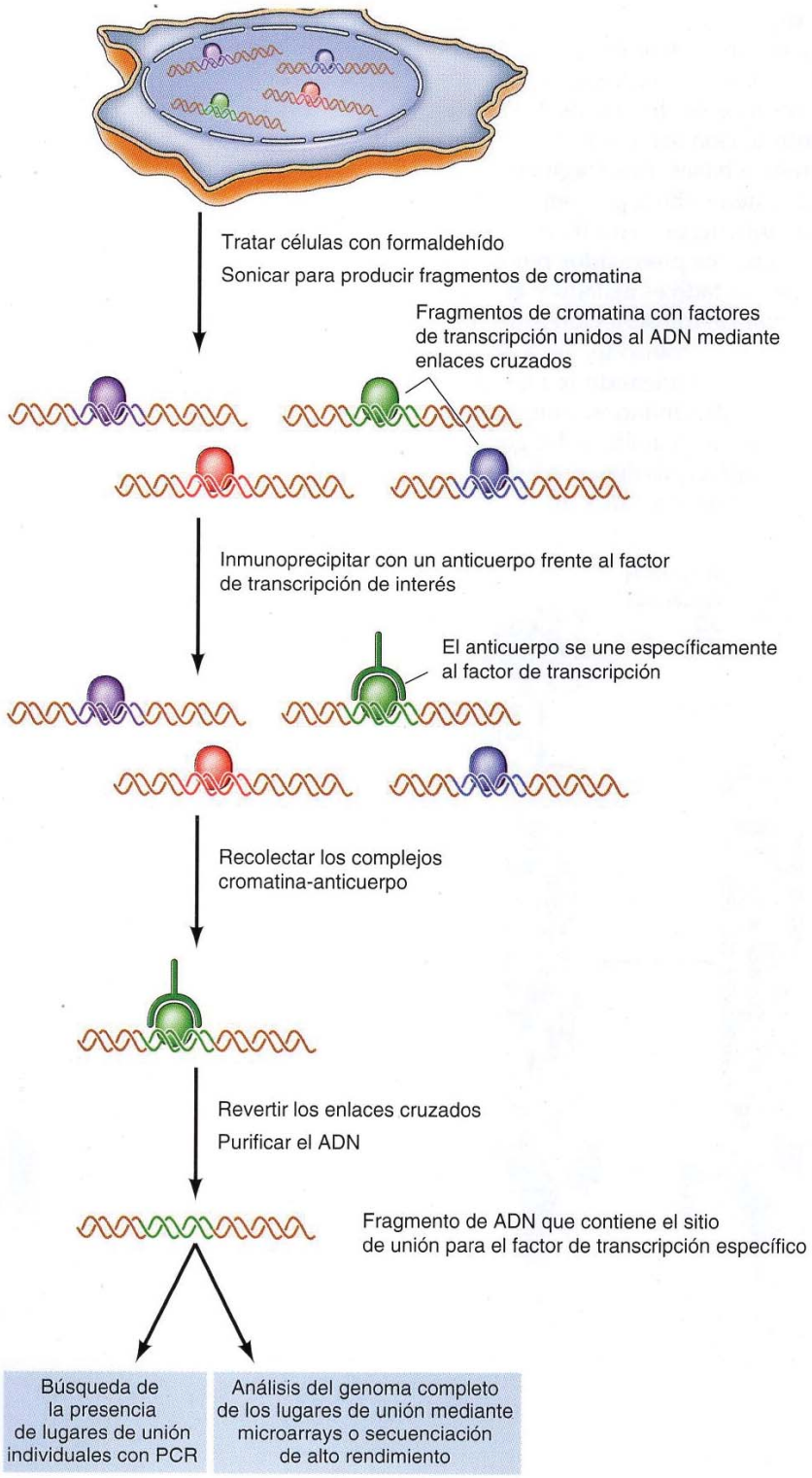


FIGURA 8.23
Inmunoprecipitación cromatínica. Las células son tratadas con formaldehído para que se formen enlaces cruzados entre el ADN y las proteínas, y a continuación son sonicadas para producir fragmentos de cromatina. Los fragmentos de cromatina son incubados con un anticuerpo contra un factor de transcripción específico, y los fragmentos de cromatina unidos al anticuerpo son recolectados como se muestra en la Figura 5.11. Los enlaces cruzados son entonces revertidos, y el ADN purificado para dar lugar a fragmentos de ADN que contienen los sitios de unión para el factor de transcripción específico de interés. Los fragmentos inmunoprecipitados se analizan con PCR para comprobar la presencia de una secuencia de ADN específica, o bien mediante técnicas globales, como hibridación a microarrays o secuenciación de ADN de alto rendimiento, con el fin de identificar todos los lugares de unión al factor de transcripción en el genoma.

ADN genómico, de modo que las secuencias reguladoras fisiológicamente significativas no pueden ser identificadas a partir de la secuencia de ADN por sí sola.

Una técnica experimental importante para la determinación de regiones de ADN que se unen a un factor de transcripción en el interior de la célula,

ha sido proporcionado por la **inmunoprecipitación cromatínica** (**Fig. 8.23**). En primer lugar las células son tratadas con formaldehído, que une a las proteínas al ADN mediante enlaces cruzados. Como resultado, los factores de transcripción están unidos covalentemente a las secuencias de ADN a las que estaban unidas en la célula viva. A continuación la cromatina es extraída y rota en fragmentos de unos 500 pares de bases. Los fragmentos de ADN unidos a un factor de transcripción de interés ahora pueden ser aislados mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo específico frente al factor de transcripción (véase Fig. 5.11). Los enlaces producidos por el formaldehído se revierten, y el ADN inmunoprecipitado es aislado y analizado para determinar los sitios a los que el factor de transcripción específico estaba unido en la célula. La unión de un factor de transcripción a un elemento regulador específico puede comprobarse empleando la PCR para detectar la secuencia en cuestión en los inmunoprecipitados cromatínicos (véase Fig. 4.22). Otra técnica consiste en realizar un análisis del genoma completo de los fragmentos de ADN inmunoprecipitados, mediante secuenciación de ADN a gran escala o bien por hibridación a microarrays (véase Figs. 5.5 y 5.6) con el fin de identificar todos los lugares a los que está unido un factor de transcripción dentro de una célula.

Proteínas de regulación transcripcional

Una variedad de proteínas reguladoras de la transcripción han sido aisladas en base a su unión a secuencias específicas de ADN. Uno de los prototipos de factores de transcripción eucariotas fue identificado inicialmente por Robert Tjian y sus colaboradores durante estudios de la transcripción del ADN de SV40. Se observó que este factor (denominado Sp1, por proteína de especificidad 1) estimulaba la transcripción mediante su unión a cajas de GC en el promotor de SV40 (véase Fig. 8.16). Es importante resaltar, que la unión específica de Sp1 a la caja GC no sólo estableció la acción de Sp1 como un factor de transcripción específico de secuencia, sino que también surgió un abordaje general para la purificación de factores de transcripción. El aislamiento de estas proteínas supuso inicialmente un formidable reto dado que están presentes en muy pequeñas cantidades (p. ej., únicamente el 0,001% de las proteínas celulares totales), difíciles de purificar por técnicas bioquímicas convencionales. Este problema fue superado por la **cromatografía de afinidad de ADN** (**Fig. 8.24**). Múlti-

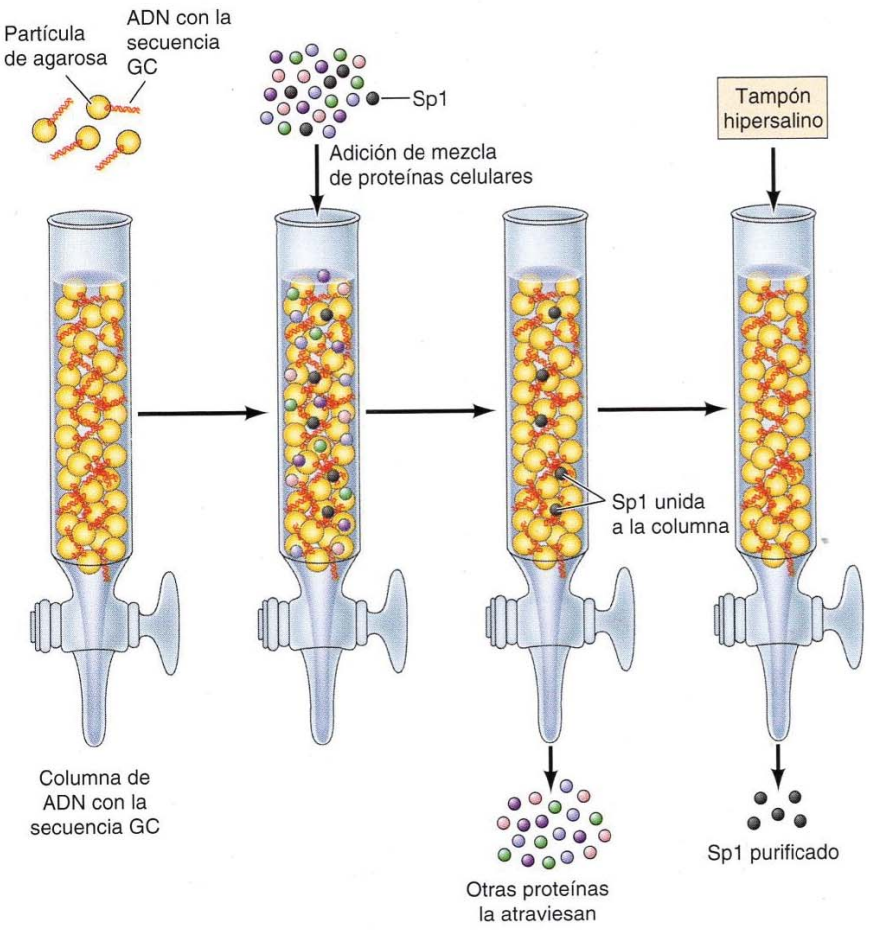
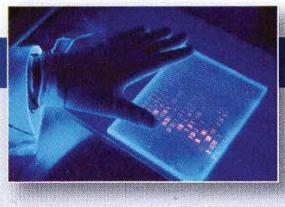


FIGURA 8.24 Purificación de la Sp1 mediante cromatografía de afinidad por ADN. Se adhieren oligonucleótidos de doble cadena que contienen secuencias repetidas de secuencias GC a partículas de agarosa, y se traspasan a una columna. Se añaden entonces a la columna una mezcla de proteínas celulares con la Sp1; dado que la Sp1 se une de manera específica a los oligonucleótidos con la secuencia GC, es retenida en la columna, mientras que otras proteínas la atraviesan. Tras lavar la columna con un tampón hipersalino se disocian la Sp1 del ADN con la secuencia GC, con lo que se obtiene la proteína Sp1 purificada.



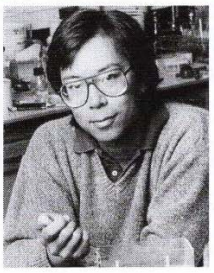
EXPERIMENTO CLAVE

Aislamiento de un factor de transcripción eucariótico

Purificación por afinidad de proteínas de unión a secuencias específicas del ADN

James T. Kadonaga y Robert Tjian
University of California, Berkeley, CA. EE.UU.

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1986, Volumen 83, págs. 5889-5893



Robert Tjian

Contexto

Tras los estudios del operón *lac* por Jacob y Monod, quedó claro que la transcripción está regulada por proteínas que se unen a determinadas secuencias de ADN. Un prototipo de los estudios de la expresión génica en células eucarióticas es el del virus de los monos SV40, en el cual se identificaron varias secuencias reguladoras del ADN a principios de la década de 1980. En 1983 William Dynan y Robert Tjian demostraron por primera vez que una de estas secuencias (la secuencia GC) es el sitio de unión específico de una proteína detectable en extractos nucleares de células humanas. Esta proteína (llamada proteína específica 1 o Sp1) no sólo se une a la secuencia GC, sino que también estimula la transcripción *in vitro*, lo que confirma que es un activador de la transcripción específico de secuencia.

Para estudiar el mecanismo de acción de la Sp1 era necesario obtener el factor de transcripción en forma pura así como clonar el gen de la Sp1. Se convirtió así en una prioridad aislar a la Sp1 de forma pura, aunque suponía un reto técnico importante. Tanto la Sp1 como otros factores de transcripción representan tan sólo alrededor del 0,001% del total de las proteínas celulares, por lo que no pueden ser purificadas por las técnicas bioquímicas convencionales. James Kadonaga y Robert Tjian solventaron el problema desarrollando un método de cromatografía por afinidad al ADN, que llevó a la purificación no sólo de la Sp1 sino también otros muchos factores de transcripción eucarióticos, abriendo por tanto el camino para el análisis molecular de la regulación de la transcripción en células eucarióticas.

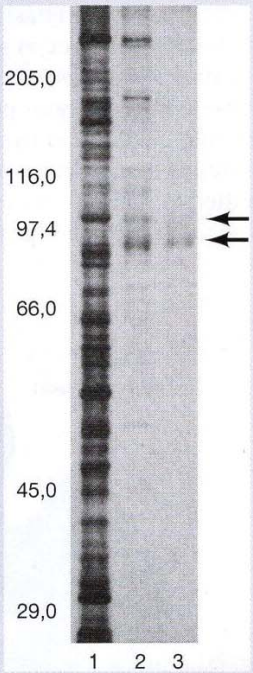
Experimentos

La cromatografía de afinidad al ADN, desarrollada por Kadonaga y Tjian, es un método que se basa en la unión específica y con una alta afinidad entre la Sp1 y la secuencia GC, GGGCGG. Se emparejaron con partículas sólidas oligonucleótidos sintéticos poseedores de múltiples copias de esta secuencia, y se hizo pasar un extracto nuclear bruto a través de esta columna de partículas ligadas a secuencias GC del ADN. A continuación las partículas fueron lavadas para eliminar las proteínas que no quedaron unidas de manera específica con los oligonucleótidos. Por último, se realizó otro lavado de las partículas con suero salino hipertónico (ClK 0,5M), con el objetivo de separar la Sp1 del ADN y liberar por tanto la Sp1 de la columna.

La electroforesis en gel demostró que el extracto nuclear bruto aplicado inicialmente a la columna era una mezcla compleja de proteínas (véase figura). Por el contrario, aproximadamente el 90% de las proteínas recuperadas tras dos ciclos de cromatografía de afinidad al ADN corresponden a sólo dos polipéptidos, identificados como Sp1 por su unión al ADN y por su actividad en estudios de transcripción *in vitro*. Por tanto, la Sp1 ha sido eficazmente purificada mediante la cromatografía de afinidad por el ADN.

Impacto

En su documento de 1986, Kadonaga y Tjian afirman que la técnica de cromatografía por afinidad al ADN «debería ser aplicable a la purificación de otras proteínas de unión a secuencias específicas del ADN». Esta predicción ha sido ampliamente confirmada; y gracias a este método ha sido posible aislar muchos factores de transcripción eucarióticos. Los genes que codifican otros factores de transcripción se han aislado por otro mecanismo alternativo (desarrollado de manera independiente por los laboratorios de Phillip Sharp y de Steven McKnight en 1988) en el cual se revisan las bibliotecas de expresión de ADNc mediante sondas de oligonucleótidos para detectar proteínas recombinantes que se unen específicamente a las secuencias deseadas del ADN. La posibilidad de aislar proteínas de unión a secuencias específicas del ADN por estos métodos ha permitido la descripción detallada de la estructura y el funcionamiento de una amplia variedad de proteínas reguladoras de la transcripción, proporcionando las bases para la actual comprensión de la expresión génica en células eucarióticas.



Purificación de la Sp1. Electroforesis en gel de las proteínas presentes inicialmente en el extracto nuclear bruto (carril 1) y de las proteínas obtenidas tras uno o dos ciclos de cromatografía de afinidad al ADN (carriles 2 y 3, respectivamente). Se indica a la izquierda del gel el tamaño de las proteínas marcadoras de peso molecular (en kilodaltons), y mediante flechas los polipéptidos de la Sp1.

ples copias de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia GC fueron fijadas a un soporte sólido, y se hicieron pasar extractos celulares a través de la columna de oligonucleótidos. Dado que la Sp1 se une a la secuencia GC con alta afinidad, quedaba específicamente retenida en la columna. Se pudo por tanto obtener proteína Sp1 altamente purificada para ser utilizada en estudios posteriores.

La cromatografía de afinidad por ADN, utilizada por primera vez en la purificación de la Sp1, ha sido utilizada con éxito para aislar una amplia variedad de proteínas de unión al ADN con especificidad de secuencia a partir de células eucariotas. Los genes que codifican otros factores de transcripción han sido aislados mediante el análisis de bibliotecas de ADNc de expresión para identificar proteínas recombinantes que se unen a secuencias específicas del ADN. El clonaje y secuenciación de ADNc de factores de transcripción ha llevado a la estructura y función de estas críticas proteínas reguladoras.

◆ Se han desarrollado factores de transcripción artificiales con dominios en dedo de zinc diseñados para unirse a secuencias específicas del genoma. Ligando diferentes dominios efectores al dominio de unión al ADN, el gen diana puede ser activado o reprimido. Esta tecnología puede aplicarse a la terapia génica y al desarrollo de plantas y animales transgénicos.

Estructura y función de los activadores de la transcripción

Dado que los factores de transcripción son fundamentales para la regulación de la expresión génica, la comprensión de sus mecanismos de acción ha sido una importante área de investigación en biología celular y molecular. De estas proteínas, las estudiadas con mayor profundidad son los **activadores de la transcripción**, que, como la Sp1, se unen a secuencias reguladoras de ADN y estimulan la transcripción. Estos factores constan en general de dos dominios: una región de la proteína se une específicamente al ADN; la otra activa la transcripción interactuando con otras proteínas, incluyendo el Mediador u otros componentes de la maquinaria de transcripción (**Fig. 8.25**). La función básica del dominio de unión al ADN es de anclar el factor de transcripción en el sitio correcto del ADN; a continuación, el dominio de activación entonces estimula, independientemente, la transcripción a través de interacciones proteína-proteína.

Actualmente se han identificado muchos factores de transcripción diferentes en células eucariotas, con unos 2.000 codificados por el genoma humano. Contienen distintos tipos de dominios de unión al ADN, algunos de los cuales se ilustran en la **Figura 8.26**. El más común es el **dominio de dedo**

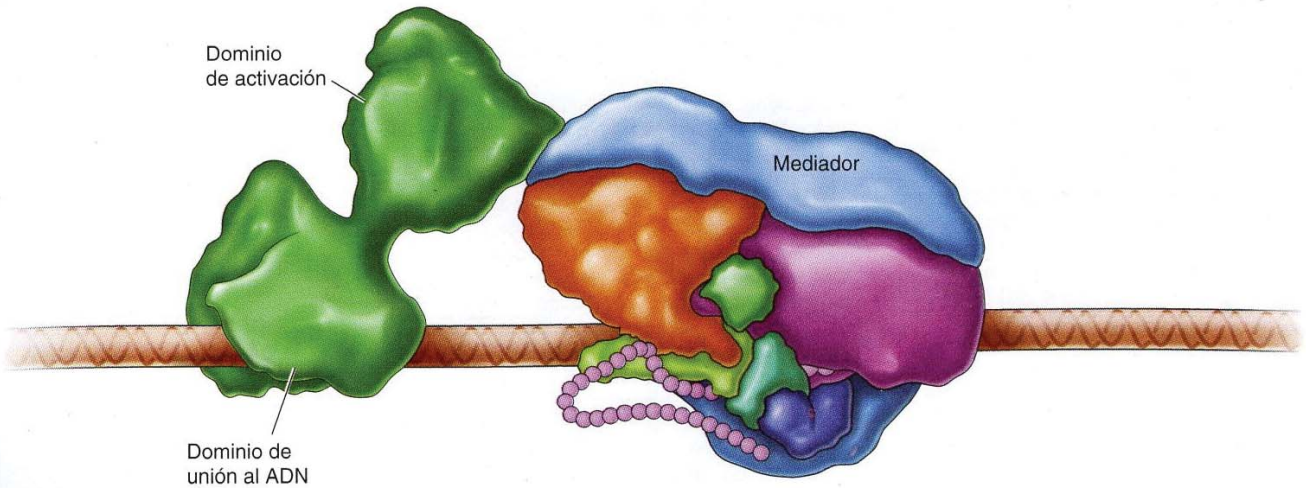


FIGURA 8.25 Estructura de los activadores de la transcripción.
Los activadores de la transcripción constan de dos dominios independientes. El dominio de unión al ADN reconoce una secuencia de ADN específica, y el dominio de activación interacciona con otros elementos de la maquinaria de la transcripción.

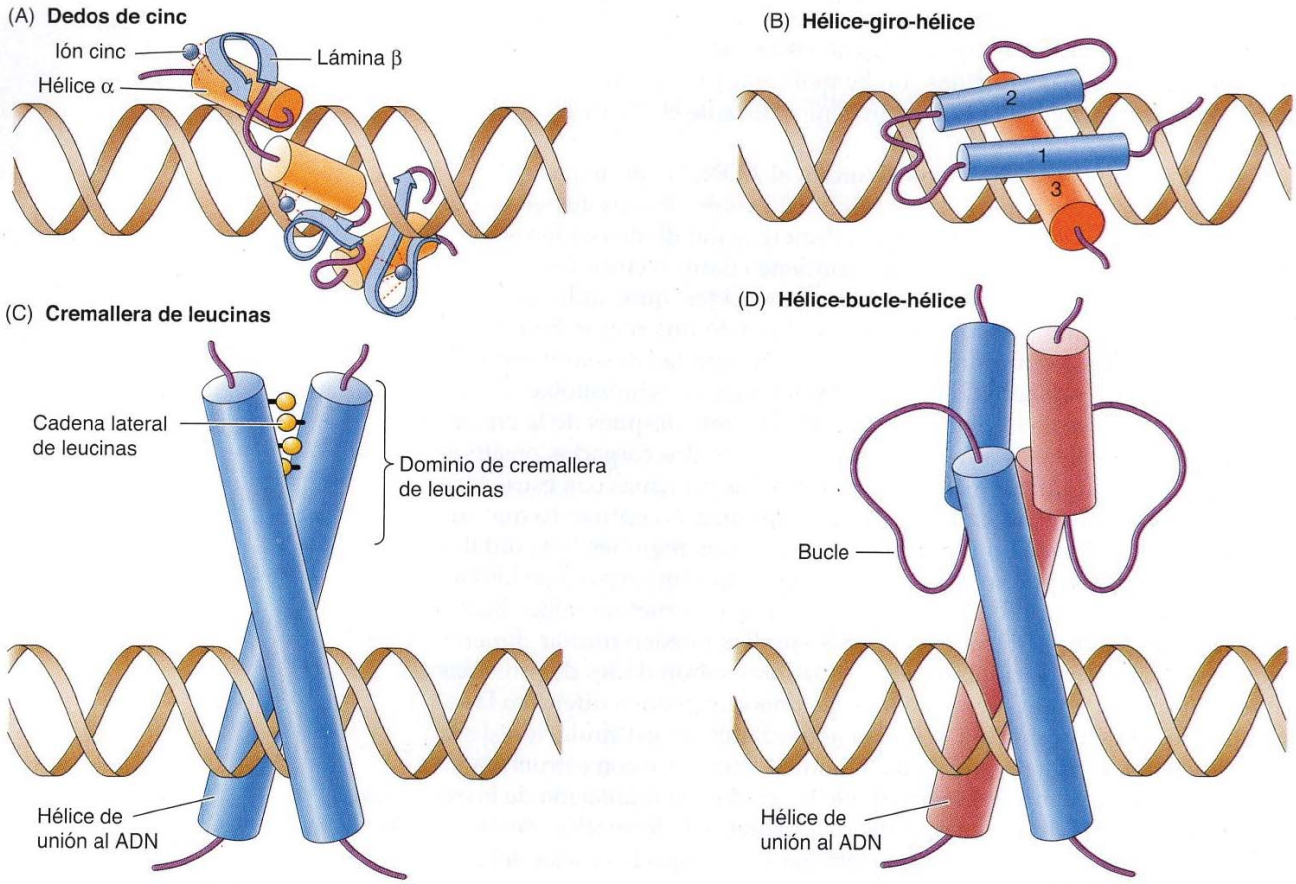


FIGURA 8.26 Familias de dominios de unión al ADN. (A) Los dominios en dedo de cinc son bucles en los que una hélice α y una lámina β engloban de manera coordinada un ión cinc. (B) Los dominios hélice-giro-hélice constan de tres regiones helicoidales (o en algunos casos cuatro). Una de las hélices (la hélice 3) es la que realiza la mayor parte de los contactos con el ADN, mientras que las hélices 1 y 2 se apoyan encima y estabilizan la interacción. (C) Los dominios de unión al ADN de proteínas con cremallera de leucinas están formados por dos cadenas polipeptídicas distintas. Las responsables de la dimerización son las interacciones entre las cadenas laterales hidrofóbicas de residuos de leucina expuestos en uno de los lados de cada región helicoidal (cremallera de leucinas). Inmediatamente detrás de la cremallera de leucinas está la hélice de unión al ADN, rica en aminoácidos básicos. (D) Los dominios con estructura hélice-bucle-hélice son parecidos a los de cremallera de leucinas, excepto en que los dominios de dimerización de cada una de estas proteínas consisten en dos regiones helicoidales separadas por un bucle.

de cinc, que contiene repeticiones cisteína e histidina que ligan iones de cinc y se pliegan en bucles («dedos») que se unen al ADN. Estos dominios fueron inicialmente identificados en el factor de transcripción de la ARN polimerasa III TFIIIA pero se encuentran también en factores de regulación transcripcionales de los promotores de la polimerasa II, incluyendo la Sp1. Otros ejemplos de factores de transcripción que posee dominios en dedos de cinc son los **receptores de hormonas esteroideas**, que regulan la transcripción génica en respuesta a hormonas como los estrógenos y la testosterona.

La estructura **hélice-vuelta-hélice** se describió inicialmente en proteínas de unión al ADN bacterianas, como la proteína activadora de catabolitos (CAP) de *E. coli*. En estas proteínas una hélice realiza la mayor parte del

contacto con el ADN, mientras que las otras hélices estabilizan la interacción. En las células eucarióticas un tipo de proteínas con conformación hélice-vuelta-hélice son las proteínas con **homeodominios**, que tienen un papel crítico en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario.

Otras dos familias de proteínas de unión al ADN, las proteínas con **cremallera de leucinas** y con **estructura hélice-bucle-hélice**, contienen dominios de unión al ADN formados por la dimerización de dos cadenas polipeptídicas. La cremallera de leucinas contiene cuatro o cinco residuos de leucina separados por intervalos de siete aminoácidos, quedando sus cadenas laterales hidrofóbicas expuestas en un lado de una región helicoidal. Esta región sirve de dominio de dimerización para las dos subunidades proteínicas, que permanecen unidas por las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de las leucinas. Inmediatamente después de la cremallera de leucinas existe una región rica en aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina) que se unen al ADN. Las proteínas con estructura de hélice-bucle-hélice tienen una estructura similar, exceptuando que sus dominios de dimerización están formados por dos regiones helicoidales cada uno, separados por un bucle. Una característica importante de los factores de transcripción con cremallera de leucinas y estructura hélice-bucle-hélice es que distintos miembros de estas familias pueden formar dímeros entre ellos. Por tanto, la combinación de distintas subunidades de proteínas puede dar lugar a un mayor abanico de factores que pueden diferir en la secuencia de ADN reconocida y en las actividades de estimulación de la transcripción. Las proteínas con cremallera de leucinas y con estructura de hélice-bucle-hélice tienen una importante función en la regulación de la expresión génica inducible con especificidad tisular, y la formación de dímeros entre diferentes miembros de sus familias es un aspecto crucial del control de su función.

Los dominios activadores de los factores de transcripción no están tan bien caracterizados como sus dominios de unión al ADN. Algunos de ellos, denominados dominios de activación acídicos, son ricos en residuos cargados negativamente (aspartato y glutamato); otros son ricos en residuos de prolina o glutamina. Los dominios de activación de los factores de transcripción eucarióticos estimulan la transcripción mediante dos mecanismos diferentes (**Fig. 8.27**). En primer lugar, interactúan con las proteínas del Mediador y con los factores de transcripción generales, como TFIIB o TFIID, para reclutar la ARN polimerasa y facilitar el ensamblaje de un complejo de transcripción sobre el promotor, similar a los activadores transcripcionales de las bacterias (véase Fig. 8.8). Además, los factores de transcripción eucarióticos interactúan con una variedad de **coactivadores** que estimulan la transcripción modificando la estructura de la cromatina, como se estudia más adelante en este capítulo.

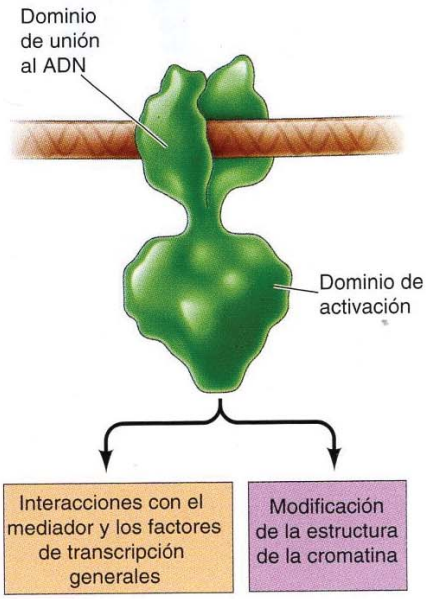


FIGURA 8.27 Actuación de los activadores transcripcionales. Los activadores eucarióticos estimulan la transcripción por dos mecanismos. (1) Interactúan con las proteínas del Mediador y con los factores de transcripción generales para facilitar el ensamblaje de un complejo de transcripción y estimulan la transcripción, y (2) interactúan con los coactivadores para facilitar la transcripción modificando la estructura de la cromatina.

Represores eucarióticos

La transcripción en células eucarióticas está regulada por represores además de por activadores de la transcripción. De igual forma que sus homólogos bacterianos, los represores de eucariotas se unen a secuencias específicas de ADN e inhiben la transcripción. En algunos casos, los represores eucarióticos simplemente interfieren con la unión de otros factores transcripcionales al ADN (**Fig. 8.28A**). Por ejemplo, la unión de un represor cerca del sitio de iniciación de la transcripción puede bloquear la interacción de la ARN polimerasa o de factores generales de transcripción con el promotor, de forma similar a los represores bacterianos. Otros represores compiten con los activadores por unirse a secuencias específicas de regulación. Algunos de estos represores contienen el mismo dominio de unión al ADN que

el activador, pero carecen de su dominio activador. El resultado de su unión al promotor o al estimulador es el bloqueo de la unión del activador, inhibiendo por tanto la transcripción.

En contraste con los represores que simplemente interfieren con la unión de activadores, muchos represores (denominados represores activos) contienen dominios específicos que inhiben la transcripción por medio de interacciones proteína-proteína (**Fig. 8.28B**). Esos represores activos son muy importantes en la regulación de la transcripción de las células animales; en muchos casos actúan como reguladores esenciales del crecimiento y la diferenciación celular. Al igual que sucede con los activadores de la transcripción, se han identificado varios tipos distintos de dominios represores.. Los objetivos de los represores también son diversos, los represores pueden inhibir la transcripción interactuando con proteínas activadoras específicas, con proteínas del Mediador o factores de transcripción generales, y con **correpresores** que actúan modificando la estructura de la cromatina.

Regulación de la elongación

La transcripción de un gran número de genes se regula a nivel de la formación del complejo de preiniciación y el comienzo de la transcripción (véanse Figs. 8.10 y 8.11). Sin embargo, también puede regularse a nivel de la elongación tanto por modulación directa de la actividad de la ARN-polimerasa como por los efectos de la estructura de la cromatina. La importancia del control de la elongación se ha puesto de relieve en algunos estudios recientes en los que se ha observado que la ARN polimerasa II comienza la transcripción de muchos genes tanto de *Drosophila* como humanos, pero poco después se detiene corriente debajo de los promotores. Estas moléculas de ARN polimerasa proseguirán la transcripción al recibir las señales adecuadas. Sorprendentemente, muchos de los genes en los que se detienen las

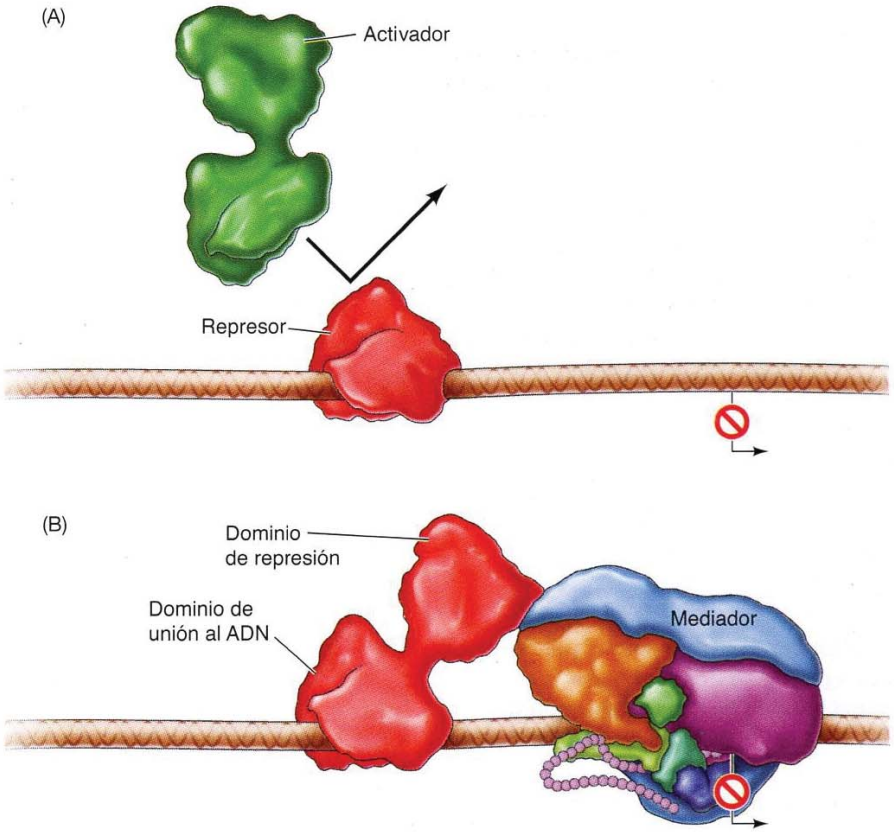


FIGURA 8.28 Acción de los represores eucarióticos. (A) Determinados represores bloquean la unión de activadores a secuencias reguladoras. (B) Otros represores tienen dominios de represión activos que inhiben la transcripción mediante interacciones con proteínas mediadoras o factores de transcripción generales, además de con correpresores que actúan para modificar la estructura cromatínica.

polimerasas están sometidos a regulación por señales extracelulares o únicamente están activos durante el período de desarrollo, lo que podría reflejar la importancia del control de la elongación transcripcional durante el desarrollo y la diferenciación.

La transcripción mediada por la ARN polimerasa II se pone en marcha tras la fosforilación de la serina-5 del CTD por acción de la TFIIH proteinquinasa (**Fig. 8.29**). Tras el comienzo de la transcripción, la polimerasa sintetiza una secuencia corta de ARN y enseguida se detiene en un sitio cercano al comienzo del gen, habitualmente a unos 50 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción. La parada de la polimerasa en este sitio obedece a la asociación de factores reguladores negativos, como NELF (factor de elongación negativo) y DSIF, que impiden la continuación de la transcripción. La reanudación de este proceso depende de la acción de otro factor, conocido como P-TEFb (factor de elongación de la transcripción positivo-b). El factor P-TEFb contiene una proteínquinasa que fosforila a los factores NELF y DSIF, además de la serina-2 del CTD de la ARN polimerasa, lo que pone en marcha de nuevo la elongación productiva y la asociación de otros factores de elongación y procesamiento al CTD.

Aparentemente, el reclutamiento de P-TEFb es el paso regulador principal en el control de la elongación, y al menos algunos activadores de la transcripción se asocian al P-TEFb y lo incorporan a los promotores. Por ejemplo, se han identificado polimerasas en pausa en cerca del 30% de los genes transcritos en células madre embrionarias humanas. Estos genes se activan por el factor de transcripción c-Myc, que se une al P-TEFb y lo incorpora a lugares próximos a sus promotores. El c-Myc, especialmente, es uno de los factores de transcripción importantes en el cáncer humano (descrito en el capítulo 19), hecho que destaca aún más la importancia de la regulación de la elongación transcripcional.

Cromatina y epigenética

Tal y como se mencionó en la exposición previa, tanto los activadores como los represores regulan la transcripción en eucariotas no sólo interaccionando con Mediador y otros componentes de la maquinaria transcripcional, sino también induciendo cambios en la estructura de la cromatina. En lugar de estar presente en el interior del núcleo como el ADN desnudo, el ADN de todas las células eucarióticas se encuentra fuertemente unido a las histonas. Este empaquetamiento de ADN de eucariotas en la cromatina tiene consecuencias importantes en términos de disponibilidad como molde para la transcripción, de manera que la estructura de la cromatina es un aspecto fundamental de la expresión génica en las células eucariotas. Es importante destacar la posibilidad de modificar las histonas de distintas maneras que influyen en la actividad transcripcional de la cromatina, de modo que la modificación de las histonas es un mecanismo clave para regular la expresión de genes eucariotas. Por otra parte, muchas modificaciones de histonas se heredan de forma estable cuando las células se dividen, con lo que proporcionan un mecanismo a través del cual los patrones de expresión génica pueden transmitirse a las células de progenie después de la mitosis.

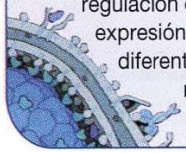
Modificaciones de histonas

La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en 147 pares de bases de ADN enrollado en torno a dos moléculas compuestas cada una por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, con una molécula de histona H1 unida al ADN donde entra en la partícula del nucleosoma (véase Fig. 6.17). La cromatina se condensa aún más, enrollándose en estructuras de orden superior organizadas en grandes bucles de ADN. El empaqueta-

VÍDEO 8.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v8.2

Mecanismos epigenéticos. La regulación epigenética de la expresión génica incluye diferentes tipos de modificaciones en la cromatina.



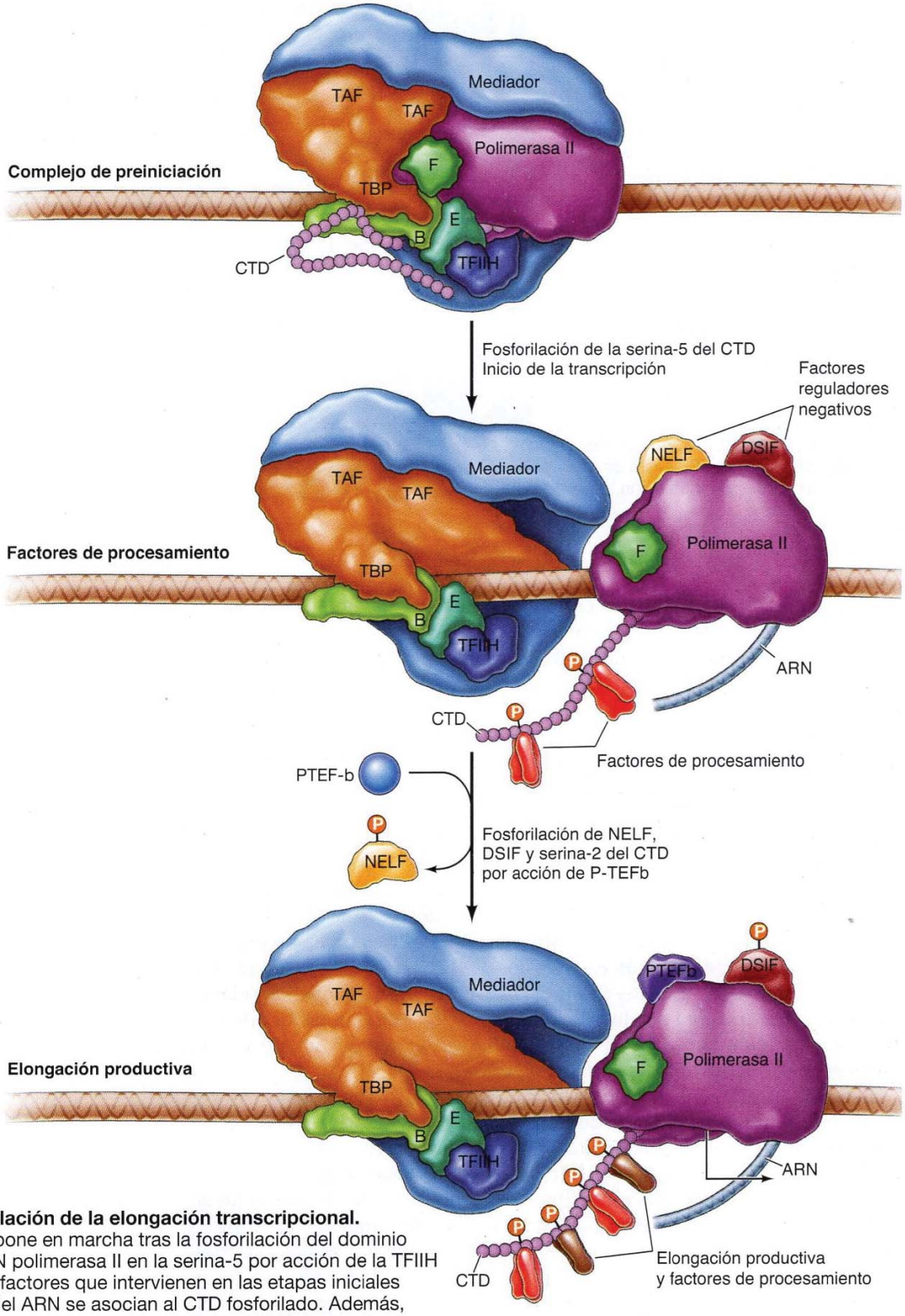


FIGURA 8.29 Regulación de la elongación transcripcional. La transcripción se pone en marcha tras la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II en la serina-5 por acción de la TFIIH proteinquinasa. Los factores que intervienen en las etapas iniciales del procesamiento del ARN se asocian al CTD fosforilado. Además, algunos factores reguladores negativos (NELF y DSIF) se asocian a la polimerasa, que se detiene a unos 50 nucleótidos de distancia del sitio de inicio de la transcripción. La transcripción (elongación productiva) se reanuda como consecuencia de la fosforilación de NELF y DSIF y la serina-2 del CTD de la polimerasa por acción de P-TEFb. El NELF así fosforilado se separa del complejo y algunos factores necesarios para la elongación y el procesamiento se incorporan al mismo.

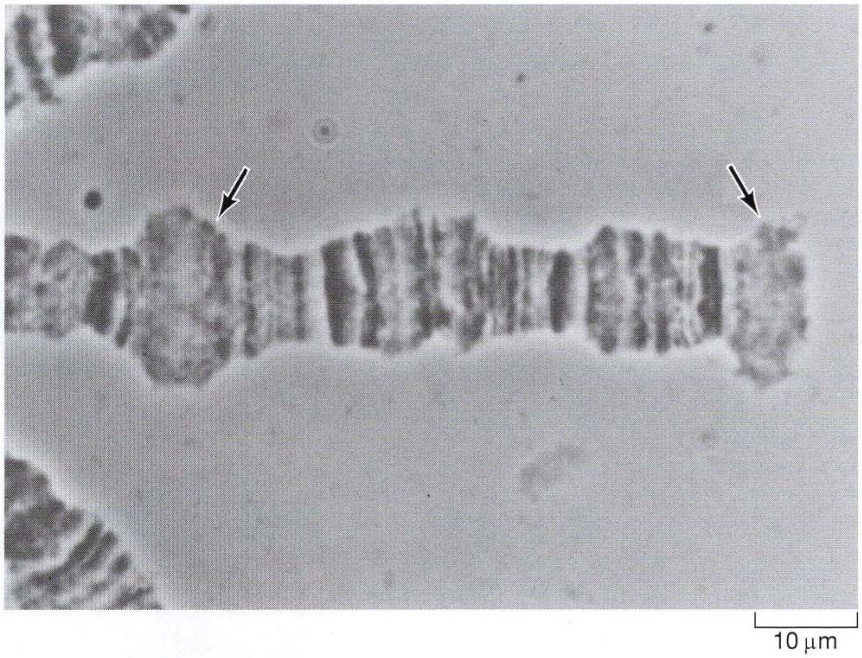


FIGURA 8.30 Regiones cromosómicas descondensadas de *Drosophila*. Imagen de microscopio óptico que muestra regiones descondensadas de cromosomas politénicos *(flechas)*, que son activas en la síntesis de ARN. (Cortesía de Joseph Gall, Carnegie Institution.)

miento del ADN eucariótico en cromatina limita su disponibilidad para la transcripción de unirse al ADN como a la capacidad de la ARN polimerasa de transcribir a través de un molde de cromatina. En regiones relativamente descondensadas de cromatina hay genes transcritos de forma activa, lo que facilita su transcripción (**Fig. 8.30**).

La estructura de la cromatina puede verse alterada por modificaciones de las histonas y reorganizaciones de los nucleosomas. El primer tipo descrito de modificación de histonas, **acetilación de las histonas** se ha correlacionado con la cromatina transcripcionalmente activa en una amplia variedad de tipos celulares (**Fig. 8.31**). Las histonas del núcleo (H2A, H2B, H3 y H4) tienen dos dominios: un dominio o extremo amino-terminal, que se extiende por fuera del nucleosoma y uno plegado, que interviene en las interacciones con otras histonas y en el enrollamiento del ADN alrededor del núcleo del nucleosoma. El extremo amino-terminal es rico en lisina y puede ser modificado por acetilación en residuos de lisina específicos. Así se neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina y parece contribuir a la activación transcripcional por medio de la relajación de la estructura de cromatina y el incremento de la disponibilidad del molde de ADN para factores de transcripción y la ARN-polimerasa.

Estudios de dos grupos de investigadores en 1996 proporcionaron vínculos directos entre la acetilación de las histonas y la regulación transcripcional, demostrando que los activadores y represores transcripcionales están asociados con histona acetiltransferasas y deacetilasas, respectivamente. Esta asociación se descubrió en primer lugar mediante la clonación de un gen que codificaba una histona acetiltransferasa de *Tetrahymena*. Sorprendentemente, la secuencia de esta histona acetiltransferasa estaba estrechamente relacionada con un coactivador transcripcional de levaduras previamente conocido. Más experimentos demostraron que la propia Gcn5p posee actividad histona acetiltransferasa, sugiriendo que la activación transcripcional resulta directamente de la acetilación de histonas. Estos resultados se han extendido mediante demostraciones de que las histonas acetiltransferasas también se asocian con un número de coactivadores transcripcionales en mamíferos, además de con el factor de transcripción

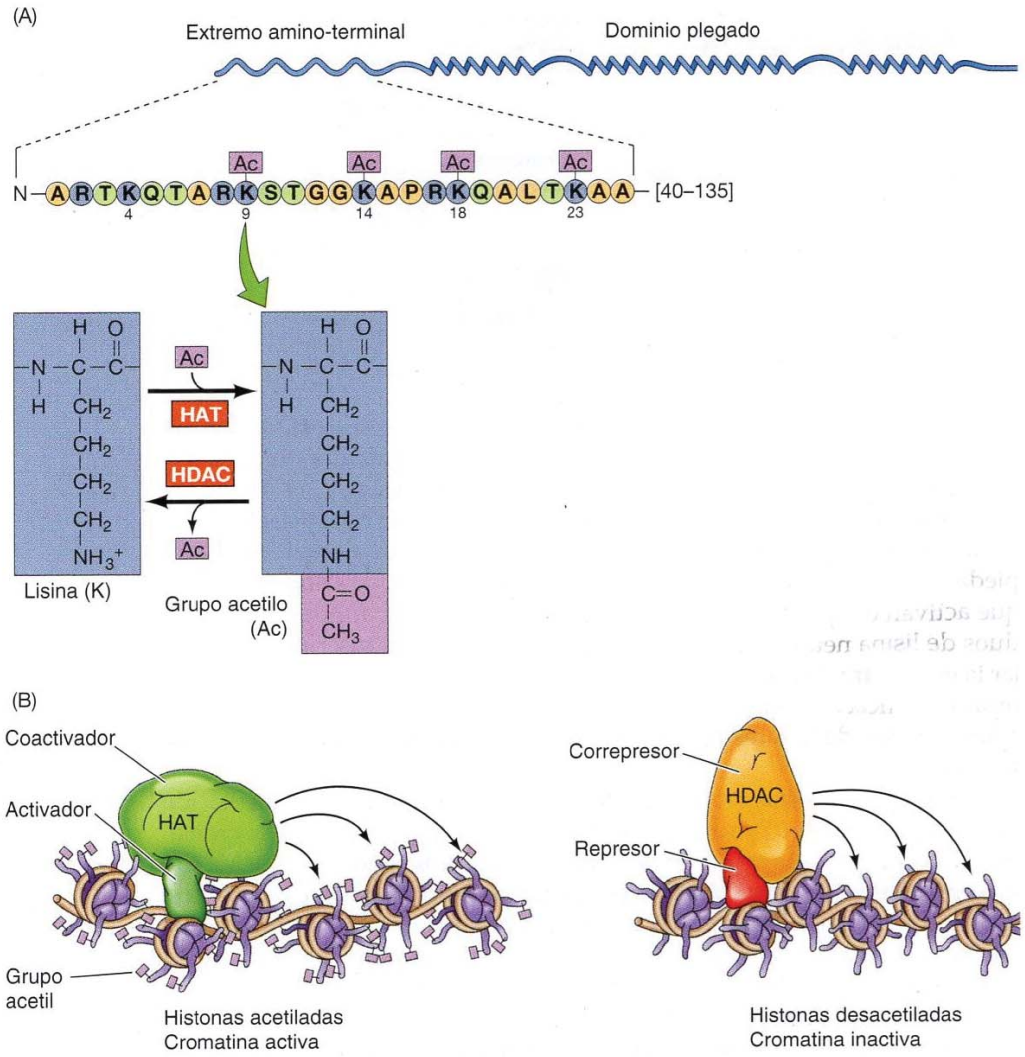


FIGURA 8.31 Acetilación de histonas. (A) Las histonas del núcleo tienen dominios plegados que interaccionan con otras histonas y con el ADN en el nucleosoma. Los extremos N-terminales de las histonas del núcleo (p. ej., H3) son modificados añadiendo grupos acetilo (Ac) en las cadenas laterales de determinados residuos de lisina. (B) Los activadores y represores de la transcripción se asocian con coactivadores y correpresores, con actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) y desacetilasa de histonas (HDAC) respectivamente. La acetilación de histonas es característica de la cromatina transcrita activamente.

general TFIID. Por el contrario, muchos correpresores transcripcionales tanto en levaduras como en células de mamífero funcionan como histonas deacetilasas, y retiran los grupos acetilo de las colas de las histonas. La acetilación de histonas es, por tanto, dirigida directamente por activadores y represores transcripcionales, lo que indica que juega un papel clave en la regulación de la expresión génica eucariótica.

Las histonas no sólo se modifican por acetilación, sino también por otros tipos de modificación, como la metilación de residuos de lisina y arginina, y la adición de péptidos pequeños (ubiquitina y SUMO, recogidos en el Cap. 9) a los residuos de lisina. Al igual que la acetilación, estas modificaciones tienen lugar en residuos aminoacídicos específicos de las colas de las histonas y se asocian a cambios de la actividad transcripcional (**Fig. 8.32**).

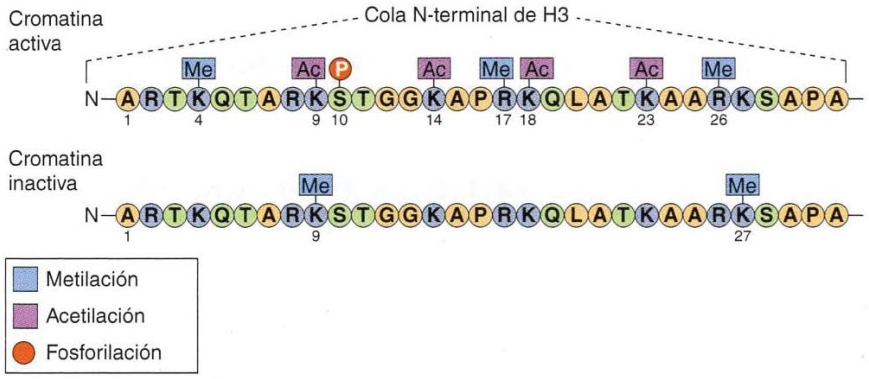


FIGURA 8.32 Metilación y fosforilación de histonas. La actividad transcripcional de la cromatina está afectada tanto por la metilación y fosforilación de residuos aminoacídicos específicos presentes en la cola de las histonas, como por acetilación. Los distintos patrones de modificación de las histonas son característicos de la cromatina transcripcionalmente activa e inactiva.

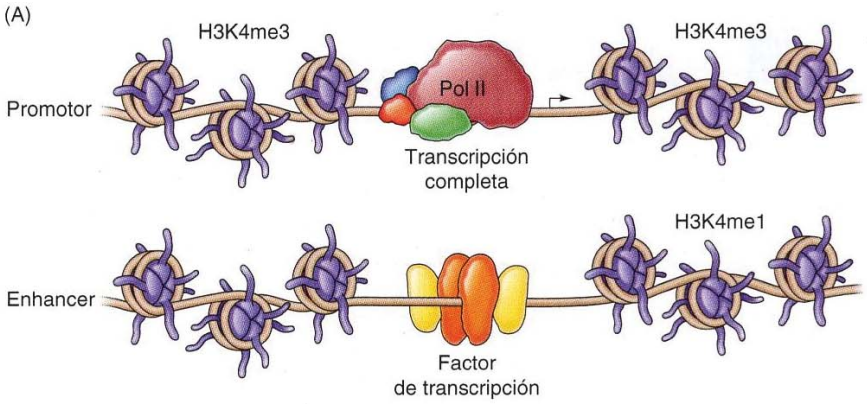
Por ejemplo, la cromatina transcripcionalmente activa está asociada con varias modificaciones específicas de la histona H3, como metilación de la lisina-4, fosforilación de la serina-10, acetilación de las lisinas 9, 14, 18 y 23, y metilación de las argininas 17 y 26. Aparentemente, las modificaciones de las histonas son capaces de afectar a la expresión génica alterando las propiedades de la cromatina y aportando lugares de unión para otras proteínas que activan o reprimen la transcripción. Por ejemplo, la acetilación de residuos de lisina neutraliza su carga positiva y facilita la transcripción al relajar la estructura de la cromatina. Además, las lisinas acetiladas, así como las otras modificaciones de las histonas que se asocian a la activación transcripcional, sirven de lugares de unión para varias proteínas que estimulan la transcripción.

A diferencia de estas modificaciones de la cromatina activa, la metilación de las H3 lisinas 9 y 27 se asocia con represión y condensación de la cromatina. Las enzimas que catalizan la metilación de estos residuos de lisina son incorporadas a los genes objetivo por parte de los correpresores. Entonces, los residuos H3 de lisina 9 y 27 metilados de la H3 sirven de lugares de unión a proteínas que inducen la condensación de la cromatina, ligando directamente esta modificación de la histona a la represión de la transcripción y formación de heterocromatina.

Los promotores y los estimuladores están marcados por distintas características de cromatina que se han utilizado para la identificación global de estas regiones. Los promotores y los estimuladores carecen de nucleosomas, con lo que su ADN es accesible para la unión de factores de transcripción (**Fig. 8.33**). Estas regiones sin nucleósidos son sensibles a la digestión con ADNasa y, así, pueden identificarse como **sitios hipersensibles a la ADNasa** en el genoma. Los nucleosomas que flanquean a estas regiones tienen diferentes modificaciones de histonas en los promotores en comparación con los estimuladores. Por ejemplo, los promotores están marcados por la forma trimetilada de H3 lisina-4 (H3K4me3), mientras que los estimuladores se caracterizan por la forma monometilada de esta lisina (H3K4me1).

Factores remodeladores de la cromatina

A diferencia de las enzimas que regulan la estructura de la cromatina a través de la modificación de las histonas, los **factores remodeladores de la cromatina** son complejos proteicos que aprovechan energía generada por hidrólisis de moléculas de ATP para alterar los contactos del ADN con las histonas (**Fig. 8.34**). Un mecanismo de acción de los factores remodeladores de la cromatina es el deslizamiento de los octámeros de las histonas a lo largo de la molécula del ADN que da lugar a la recolocación de los nucleosomas para alterar la accesibilidad de secuencias específicas de ADN para los factores de transcripción. Por otra parte, los factores remodeladores de la cromatina pueden inducir cambios conformacionales en los nucleoso-



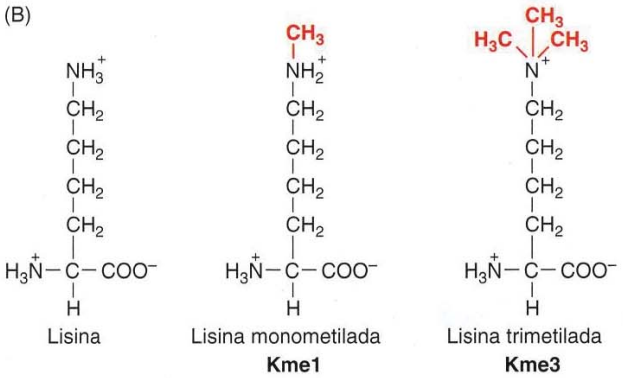


FIGURA 8.33 Cromatina en los promotores y los estimuladores. (A) Los promotores y los estimuladores no tienen nucleosomas, con lo cual su ADN queda disponible para los factores de transcripción. Los promotores de flanqueo de los nucleosomas están marcados por la lisina-4 H3 trimetilada (H3K4me3), mientras que los estimuladores lo están por la forma monometilada de esta lisina (H3K4me1). (B) Estructuras de la lisina monometilada y trimetilada.

mas que también afectarían a la capacidad de secuencias específicas de ADN de interaccionar con proteínas reguladoras transcripcionales. Por último, los factores remodeladores de la cromatina son capaces de expulsar a las histonas del ADN, dejando regiones libres de nucleosomas, presentes a menudo en los *enhancer* y promotores (véase Fig. 8.33). Al igual que las enzimas modificadoras de enzimas, los factores remodeladores pueden incorporarse al ADN en asociación con activadores o represores transcripcionales y alterar la organización de los nucleosomas con el fin de estimular o inhibir la transcripción.

El reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas y factores remodeladores del nucleosoma por los activadores transcripcionales estimula la iniciación de la transcripción alterando la estructura cromatínica de las regiones *enhancer* y promotoras. Sin embargo, tras la iniciación de la transcripción, la ARN polimerasa sigue enfrentándose al problema de la elongación transcripcional a través del molde de cromatina. Esto se ve facilitado por los **factores de elongación** que se asocian al dominio C-terminal fosforilado de la ARN polimerasa II cuando comienza la elongación productiva (véase Fig. 8.29). Entre estos factores figuran enzimas modificadoras de histonas (por ej., histona acetilasa) y factores remodeladores de la cromatina que desplazan temporalmente a los nucleosomas en el transcurso de la transcripción.

Histonas y herencia epigenética

Una característica importante de las modificaciones de las colas de histona es el hecho de que las histonas modificadas actúan como puntos de unión para las proteínas que, a su vez, catalizan las modificaciones de histonas. Estas modificaciones pueden regularse entre sí, para dar lugar al estableci-

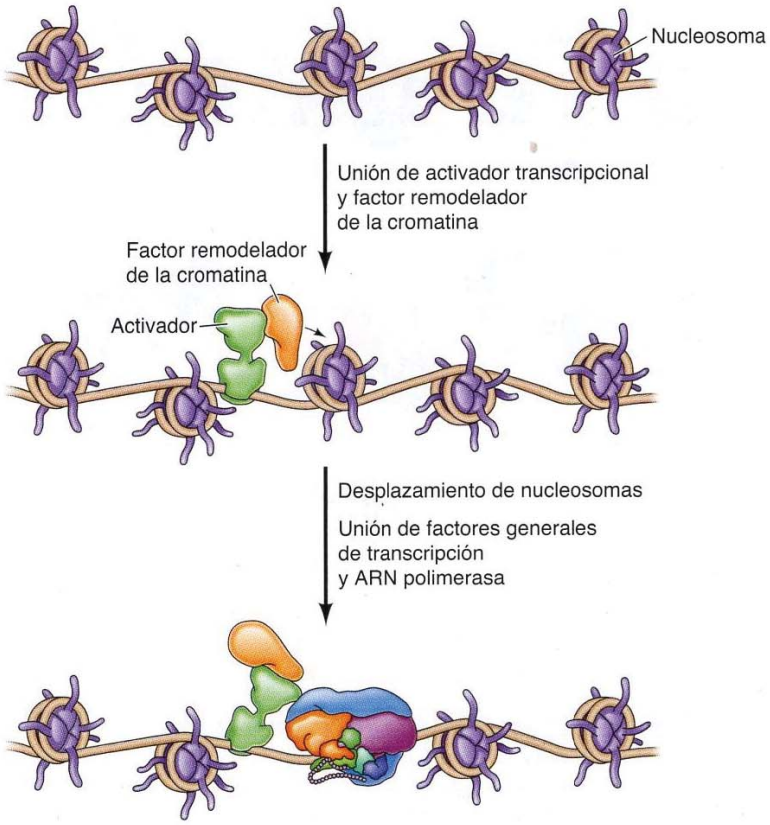


FIGURA 8.34 Factores remodeladores de la cromatina. Los factores remodeladores de la cromatina alteran la organización o la estructura de los nucleosomas. Por ejemplo, un factor remodelador asociado a un activador transcripcional podría facilitar la unión de un factor general de transcripción y la ARN polimerasa a la cromatina mediante el desplazamiento de los nucleosomas del promotor.

miento de patrones estables de cromatina modificada. En consecuencia, la modificación de histonas proporciona un mecanismo para la **herencia epigenética**, la transmisión de información que no está contenida en la secuencia de ADN a las células hijas en la división celular. Este hecho es especialmente importante para el mantenimiento de tipos celulares diferenciados durante el desarrollo de organismos multicelulares, dado que aporta un mecanismo por el cual los distintos programas de expresión génica característicos de cada tipo celular pueden transmitirse a las células descendientes durante la mitosis. Como se vio en el Capítulo 6, cuando el ADN se replica, los nucleosomas parentales se distribuyen a las dos hebras descendientes. Por lo tanto, las histonas modificadas serán transferidas desde los cromosomas parentales a los descendientes (**Fig. 8.35**). Estas histonas modificadas pueden dirigir modificaciones similares de histonas recién sintetizadas, con lo que mantienen un patrón de modificación de histonas característico de la cromatina activa o inactiva.

Se ofrece un buen ejemplo mediante la represión de los genes reguladores clave que determinan el destino de la célula durante el desarrollo de *Drosophila*. Una vez que estos genes se reprimen en células específicas del embrión en desarrollo, esta represión se traslada a las células hijas a través de numerosas divisiones celulares posteriores. La represión se mantiene mediante estas divisiones de células embrionarias como consecuencia de la metilación de H3 lisina 27 por las **proteínas Polycomb** (**Fig. 8.36**). Las proteínas Polycomb consisten en dos complejos, designados como complejos represivos Polycomb (PRC) 1 y 2. Una de las proteínas de PRC1 se une con la H3 lisina 27 metilada, mientras que una de las proteínas de PRC2 es una enzima que metila la H3 lisina 27. Como consecuencia, la metilación de H3 lisina 27 puede difundirse a los nucleosomas adyacentes y se mantiene cuando las células se dividen. Los genes que son reprimidos a través de esta

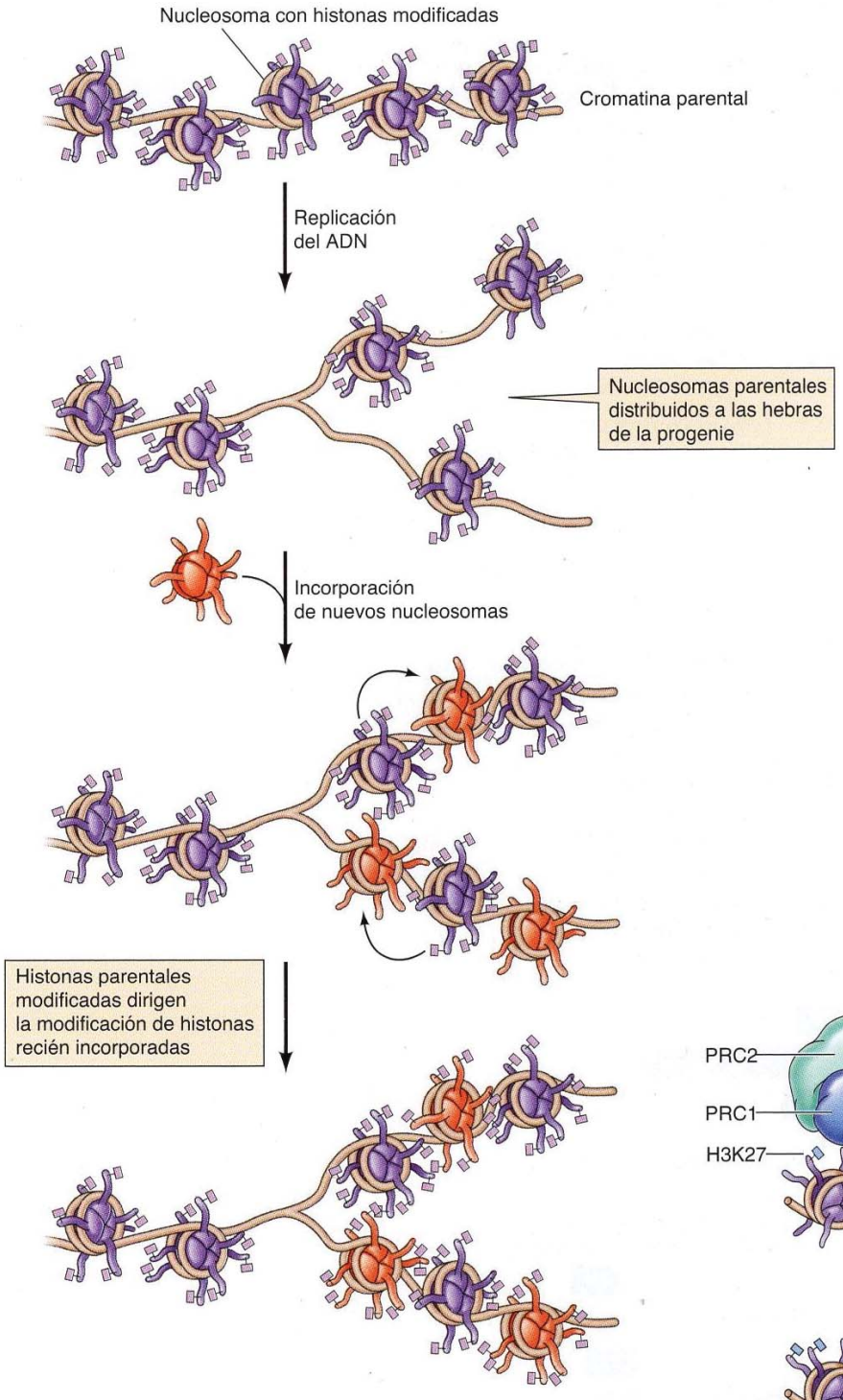


FIGURA 8.35 Herencia epigenética de las modificaciones de las histonas. Los nucleosomas parentales, que contienen histonas modificadas, se distribuyen en ambas hebras durante la replicación del ADN. Las histonas parentales modificadas pueden inducir unos cambios similares en las histonas recién sintetizadas que se han incorporado a los cromosomas de la progenie.

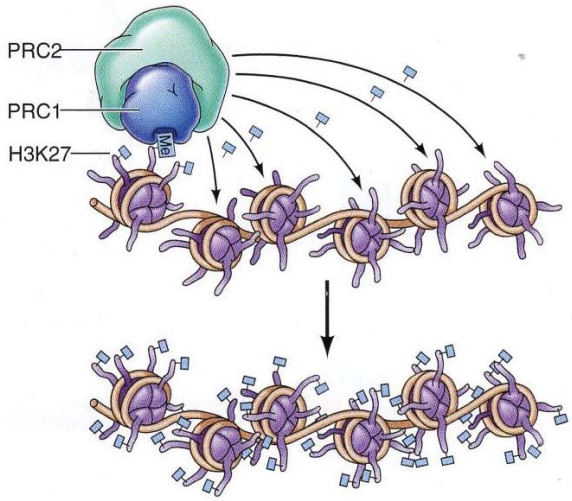


FIGURA 8.36 Proteínas Polycomb. Polycomb El complejo represivo Polycomb (PCR) 1 se une a H3 lisina 27 metilada (H3K27) y PRC2 metila los residuos de lisina 27 de nucleosomas adyacentes. El complejo de PRC1 y PRC2 puede difundir así la metilación de H3 lisina 27 a los nucleosomas vecinos.

marca de cromatina en una célula parental permanecen así reprimidos en las células hijas.

Las fronteras entre las regiones de cromatina caracterizadas por algunas modificaciones de histonas, incluida la metilación de H3 lisina 27, guardan una correlación con los dominios de asociación topológicos (TAD) que, como se indicó anteriormente, restringen las acciones de los estimuladores y los promotores (véase Fig. 8.20). Por ejemplo, las regiones de cromatina caracterizadas por la metilación de H3 lisina 27 a menudo están separadas de regiones de cromatina transcripcionalmente activas adyacentes por sitios de unión de CTCF. La proteína arquitectónica CTCF puede desempeñar así un papel activo en el establecimiento de las fronteras de dominios de modificación de cromatina, así como de las fronteras de los TAD.

Metilación del ADN

La metilación del ADN es otro mecanismo para el control epigenético de la transcripción en eucariotas. Los residuos de citosina en el ADN de los hongos, plantas y animales pueden ser modificados por la adición de grupos metilo en la posición del carbono-5 (**Fig. 8.37**). El ADN es metilado específicamente en las citosinas (C) que preceden a guaninas (G) en la cadena de ADN (dinucleótido CpG) y esta metilación se correlaciona con la represión transcripcional. La metilación generalmente ocurre en el interior de los elementos transponibles, parece que la metilación juega un papel clave en la supresión del movimiento de transposones a lo largo del genoma. Adicionalmente, la metilación del ADN se asocia con la represión transcripcional de genes de mamíferos que intervienen en el desarrollo y diferenciación, en concierto con alteraciones en la estructura de la cromatina.

La metilación del ADN, como la modificación de histonas, es un mecanismo importante de herencia epigenética. Los patrones de metilación del ADN se mantienen de forma estable tras la replicación del ADN por acción de una enzima que metila específicamente secuencias CpG de una hebra hija unida a través de puentes de hidrógeno a la hebra parental metilada (**Fig. 8.38**). En consecuencia, un gen metilado y reprimido en una célula pa-

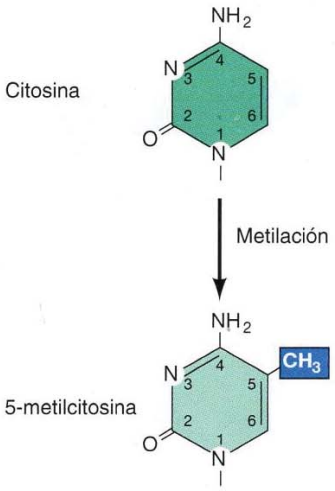


FIGURA 8.37 Metilación del ADN. Se añade un grupo metilo al carbono en posición 5 de los residuos de citosina del ADN.

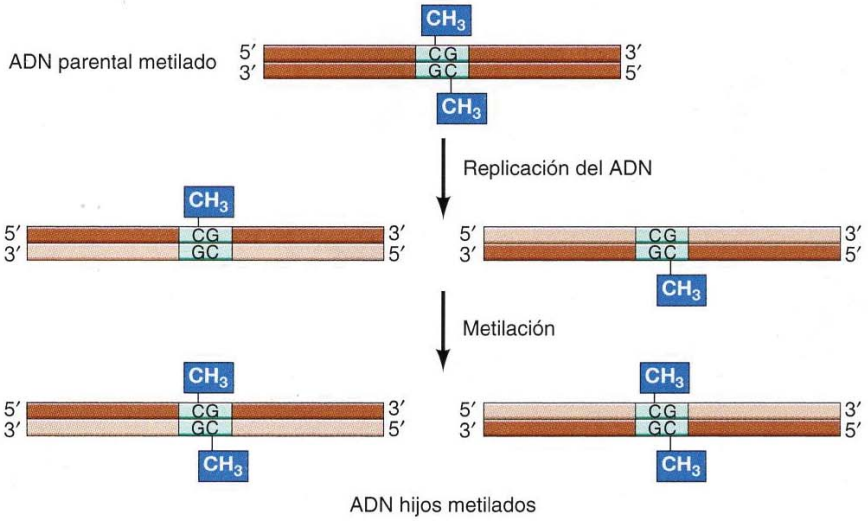


FIGURA 8.38 Mantenimiento de los modelos o patrones de metilación. En el ADN parental, ambas hebras se encuentran metiladas en las secuencias complementarias CpG. Después de la replicación, sólo la hebra parental de cada molécula hija se encuentra metilada. Las hebras hijas de nueva síntesis se metilan a continuación mediante una enzima que reconoce específicamente las secuencias CpG opuestas al sitio de metilación.

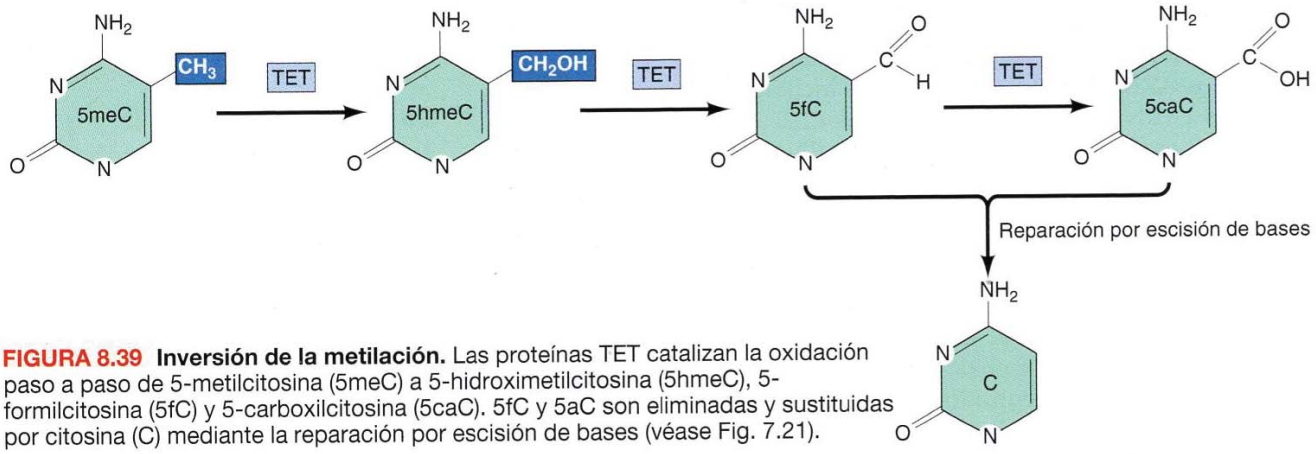


FIGURA 8.39 Inversión de la metilación. Las proteínas TET catalizan la oxidación paso a paso de 5-metilcitosina (5meC) a 5-hidroximetilcitosina (5hmeC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). 5fC y 5aC son eliminadas y sustituidas por citosina (C) mediante la reparación por escisión de bases (véase Fig. 7.21).

rental continuará estándolo en las células hijas. La metilación puede invertirse también por las enzimas de la familia TET, que catalizan la oxidación de 5-metilcitosina a 5-formilcitosina y 5-carboxilcitosina, que son escindidas y sustituidas por citosina por medio de reparación de ADN (**Fig. 8.39**). De este modo, la metilación puede invertirse activamente, así como transmitirse por vía epigenética.

Un papel regulador importante de la metilación del ADN se ha establecido en el fenómeno conocido como **impresión** o ***imprinting* genómico** que controla la expresión de algunos genes implicados en el desarrollo embrionario de mamíferos. En la mayoría de los casos, tanto los alelos maternos como los paternos de un gen están expresados en las células diploides. Sin embargo, existen algunos genes impresos (se han descrito unos 75 en ratones y humanos) cuya expresión depende de si se heredan de la madre o del padre. En algunos casos, sólo es expresado el alelo parental de un gen impreso, y el alelo materno es transcripcionalmente inactivo. En otros genes impresos, el alelo materno es expresado y el alelo paterno es inactivo.

La metilación del ADN parece jugar un papel clave en la diferenciación entre alelos paternos y maternos de los genes impresos. Un buen ejemplo es el gen *H19*, que se transcribe sólo a partir de la copia materna (**Fig. 8.40**). El gen *H19* es metilado específicamente durante el desarrollo de células germinales masculinas, pero no en las femeninas. La unión del esperma y del óvulo en la fertilización, genera, por tanto, un embrión que contiene un alelo paterno metilado y un alelo materno sin metilar. Así, el alelo *H19* paterno permanece metilado y transcripcionalmente inactivo en las células embrionarias y en los tejidos somáticos. Sin embargo, el alelo *H19* paterno pierde la metilación en la línea germinal, permitiendo que se establezca un nuevo patrón de metilación para su transmisión a la siguiente generación. Curiosamente, el *H19* codifica un ARN no codificante largo (ARNInc) que regula la expresión de otros genes sometidos a impronta genómica.

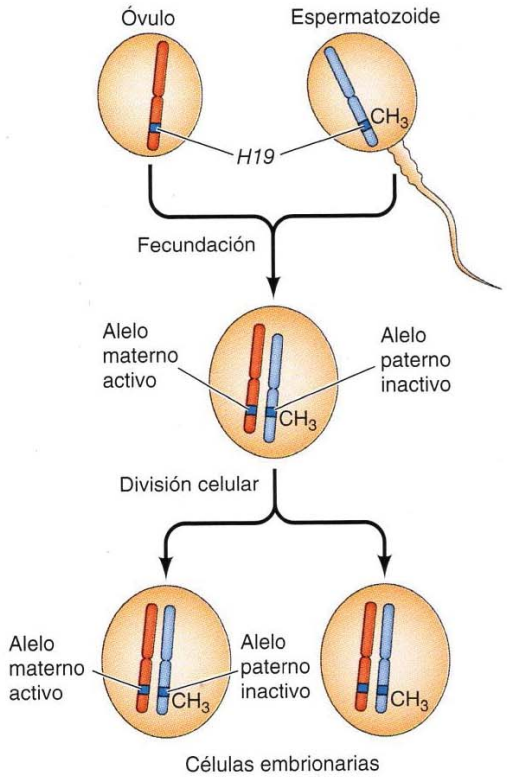


FIGURA 8.40 Impresión genómica. El gen *H19* es metilado de forma específica durante el desarrollo de las células germinales masculinas. Por este motivo los espermatozoides contienen un alelo *H19* metilado y los óvulos uno no metilado. Con la fecundación y ulteriores divisiones celulares, el alelo paterno continuará estando metilado e inactivo respecto a la transcripción, de modo que solamente se expresará el alelo materno no metilado en el embrión.

ARN no codificantes

Una serie de avances recientes ha resaltado el papel de los ARN no codificantes, lo que incluye microARN (ARNmi) y **ARN largos no codificantes (ARNlnc)** en la regulación génica. Los ARNmi (20-30 nucleótidos) actúan en general a través de la vía de interferencia de ARN (véase Fig. 4.38) para inhibir la traducción o inducir la degradación de ARNm homólogos, y la regulación génica en su nivel postranscripcional, se abordarán más adelante en este capítulo y en el Capítulo 9. Tal como se indica en el Capítulo 6, los análisis globales de transcripción en células humanas han centrado también la atención en el cometido de los ARNlnc (> 200 nucleótidos) en la regulación génica. En el genoma humano se codifican más de 50.000 ARNlnc. Aunque las funciones de este número inesperadamente largo de ARNlnc aún debe determinarse, al parecer al menos una de las funciones importantes de los ARNlnc consiste en regular la expresión génica en el nivel transcripcional.

Muchos ARNlnc forman complejos con proteínas que modifican la cromatina y reclutan estos complejos de modificación de la cromatina en sus puntos de transcripción, con lo cual regulan la expresión de genes vecinos. En muchos casos, incluido el ARNlnc *Xist* que media en la inactivación del cromosoma X en los mamíferos (véase Capítulo 6), y varios ARNlnc que intervienen en la impresión (véase Fig. 8.40), los ARNlnc actúan para reprimir sus genes diana mediante la formación de complejos con el Complejo Represivo Polycomb 2 (PRC2). Ello conduce a la metilación de la histona H3 lisina 27 y al silenciamiento transcripcional (**Fig. 8.41A**). Otros ARNlnc reprimen sus genes diana a través de la formación de complejos con una histona H3 lisina 9 metilasa, que también induce el silenciamiento transcripcional (véase Fig. 8.32), o con ADN-metiltransferasas, que establecen la metilación de ADN represivo. Sin embargo, es importante señalar que no todos los ARNlnc reprimen la transcripción de sus genes diana; algunos están asociados a modificadores de cromatina que activan la transcripción, como histona acetilasas y enzimas que metilan la histona H3 lisina 4 (véase Fig. 8.32). Así, los ARNlnc pueden asociarse con diferentes enzimas modificadoras de la cromatina y actuar como represores o como activadores de sus genes diana.

Aunque muchos ARNlnc actúan en *cis* para regular la expresión de genes vecinos mediante reclutamiento de modificadores de cromatina en sus propios sitios de transcripción, algunos ARNlnc lo hacen en *trans* para influir en la expresión de genes diana distantes (**Fig. 8.41B**). Por ejemplo, el ARNlnc *HOTAIR* es un importante regulador del desarrollo que dirige centenares de genes en el genoma humano. Recluta PRC2 y un complejo que desmetila la histona H3 lisina 4, con lo que induce dos modificaciones de cromatina represiva en sus genes diana. El mecanismo por el cual los ARNlnc de acción *trans*, como *HOTAIR*, encuentran sus genes diana aún debe determinarse. Una posibilidad es que los ARNlnc reconozcan sus secuencias de ADN diana por apareamiento de bases homólogas. Alternativamente, los ARNlnc pueden formar complejos con proteínas, como factores de transcripción, que dirigen los ARNlnc a secuencias de ADN específicas.

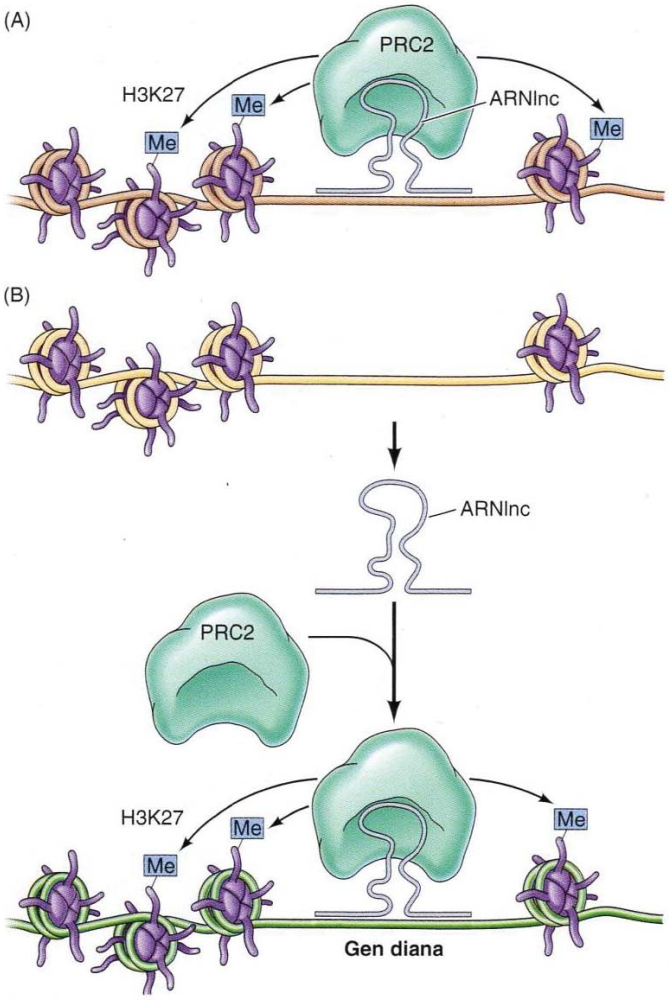


FIGURA 8.41 Acción de los ARNlnc. (A) Muchos ARNlnc reclutan el complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) en sus puntos de transcripción, para llevar a la metilación de H3 lisina 27 (H3K27) y a la represión de los genes vecinos. (B) Algunos ARNlnc actúan en *trans* mediante el reclutamiento de complejos de modificación de cromatina (p. ej., PRC2) a genes diana distantes, ya sea por unión a secuencias de ADN homólogo o a proteínas de unión a ADN (p. ej., factores de transcripción).

Aunque el reclutamiento de complejos modificadores de la cromatina es un mecanismo común de la acción de los ARNlnc, no es la única forma por la que los ARNlnc pueden regular la expresión génica. Algunos ARNlnc regulan la transcripción mediante interacciones con factores de transcripción, mediador o componentes de la maquinaria de transcripción basal (p. ej., TFIIB). Otros ARNlnc interaccionan con proteínas que regulan los niveles postranscripcionales de la expresión génica, como el procesamiento o traducción de ARNm. También debe destacarse que los estimuladores activos se transcriben para producir ARN no codificantes denominados ARN estimuladores (ARNe). Aunque los ARNe pueden representar subproductos no funcionales de la transcripción normal, las evidencias recientes sugieren que al menos algunos ARNe pueden desempeñar un papel en la regulación transcripcional de genes adyacentes. Los mecanismos y la extensión de la regulación génica por múltiples tipos diferentes de ARN no codificante aún representan un área de investigación activa y, en buena medida, inexplorada.

Maduración y renovación del ARN

Aunque la transcripción es el primer y más regulado paso en la expresión génica, es sólo el principio de una serie de procesos requeridos para producir un ARN funcional. La mayor parte del ARN de nueva síntesis ha de ser modificado de varias formas para convertirse en su forma funcional. Los ARNm bacterianos son una excepción; como fue expuesto al inicio de este capítulo, se utilizan mientras están siendo transcritos como moldes para la síntesis de proteínas. Sin embargo, los transcritos primarios de los ARNr y ARNt han de pasar por una serie de pasos de maduración tanto en bacterianos como en eucariotas. Los transcritos primarios de los ARNm eucarióticos son sometidos a grandes modificaciones, incluyendo la eliminación de intrones por corte y empalmado, antes de ser transportados desde el núcleo al citoplasma para servir de moldes en la síntesis de proteínas. La regulación de estos pasos de maduración proporciona un nivel adicional de control de la expresión génica, al igual que la regulación de la tasa de degradación de los ARNm.

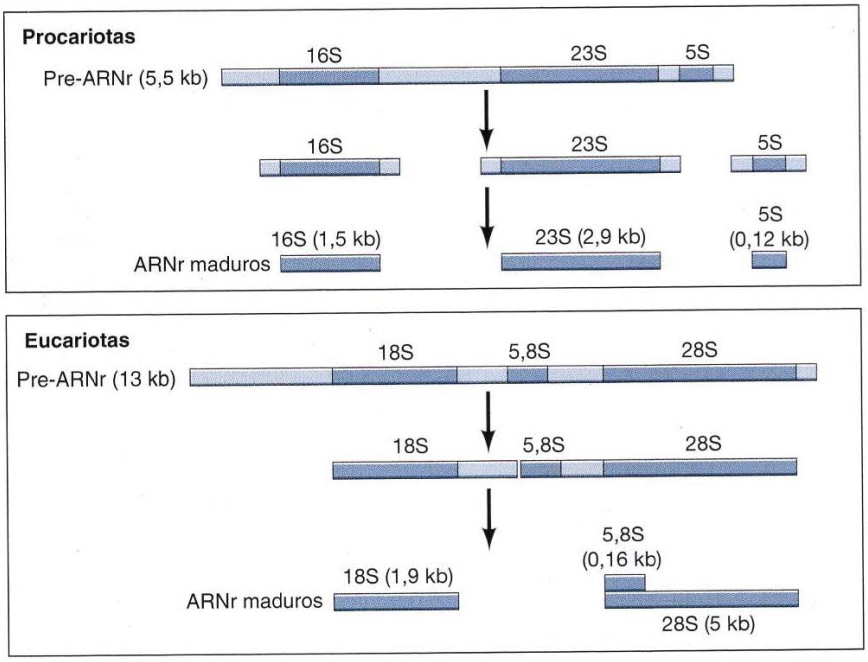


FIGURA 8.42 Maduración del ARN ribosómico. Las células procarióticas contienen tres ARNr (16S, 23S y 5S) formados por el corte de un transcrito pre-ARNr. Las células eucarióticas (p. ej., las células humanas) contienen cuatro ARNr. Uno de ellos (el ARNr 5S) se transcribe de un gen diferente; los otros tres (18S, 28S y 5,8S) derivan de un pre-ARNr común. Después del corte, el ARNr 5,8S (que es exclusivo de eucariotas) se une al ARNr 28S mediante puentes de hidrógeno.

Maduración de los ARN ribosómicos y de transferencia

Como era de esperar, dado su papel crucial en la síntesis de proteínas, el procesamiento o maduración básicos de los ARN ribosómicos y de transferencia es similar en bacterias y eucariotas. Los eucariotas poseen cuatro tipos de ARN ribosómico (véase Tabla 8.1), tres de los cuales (los ARNr 5,8S, 18S y 28S) proceden del corte de un transcrito precursor único de gran tamaño, denominado **pre-ARNr** (**Fig. 8.42**). Los bacterias poseen tres ARN ribosómicos (23S, 16S y 5S), que son equivalentes a los ARNr 28S, 18S y 5,8S de las células eucarióticas y son también obtenidos a partir de un pre-ARNr único.

El único ARNr que no es apenas procesado es el ARNr 5S en eucariotas, que se transcribe a partir de un gen distinto.

Los pre-ARNr procarióticos y eucarióticos son madurados en varios pasos. El corte inicial del pre-ARNr bacteriano produce precursores separados para los tres ARNr; estos continúan su maduración por medio de escisiones secundarias hasta obtener sus productos finales. En las células eucarióticas el pre-ARNr sufre inicialmente un corte en un sitio adyacente al ARNr 5,8S en su extremo 5′, dando dos precursores que contienen el ARNr 18S y los ARNr 28S +plus y 5,8S, respectivamente. Escisiones posteriores dan lugar a los productos finales, tras lo que el ARNr 5,8S se une por medio de puentes de hidrógeno a la molécula 28S. Además de los procesos de corte, en la maduración del ARNr tiene lugar la adición de grupos metilo a las bases y residuos de azúcares de nucleótidos específicos y la conversión de algunas uridinas en pseudouridinas. La maduración del ARNr tiene lugar en el interior del nucléolo de las células eucarióticas, y se estudiará en detalle en el Capítulo 10.

De igual forma que los ARNr, tanto los ARNt bacterianos como los eucarióticos son sintetizados como moléculas precursoras de gran tamaño (**pre-ARNt**), alguna de las cuales contiene las secuencias de varios ARNt individuales (**Fig. 8.43**). En bacterias algunos ARNt proceden de los transcritos pre-ARNr. El procesamiento del extremo 5′de los pre-ARNt se realiza por escisión por una enzima denominada **ARNasa P**, que es especialmente interesante porque es un prototipo de reacción catalizada por una enzima compuesta por ARN. La ARNasa P contiene

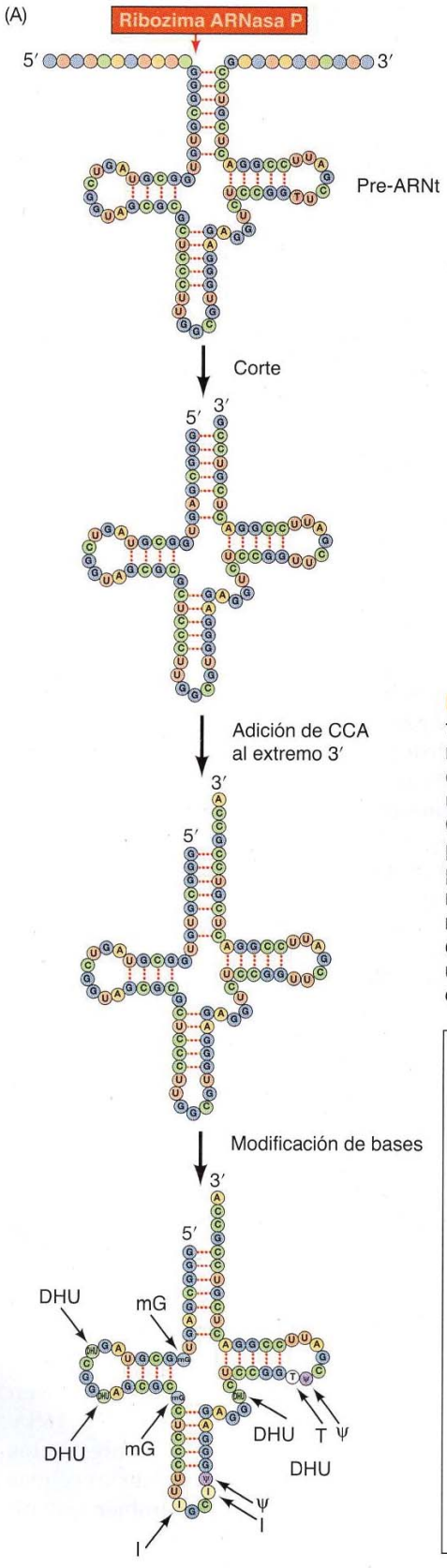
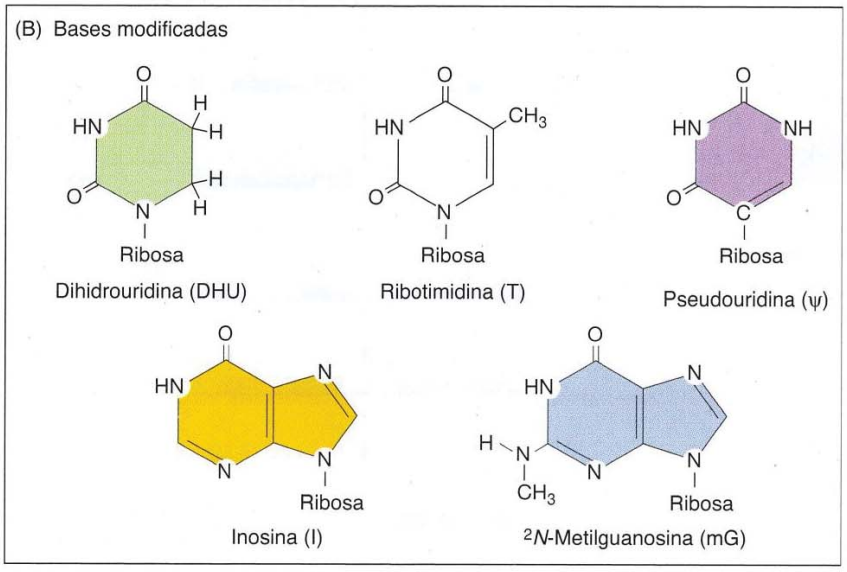


FIGURA 8.43 Maduración del ARN de transferencia. (A) Los ARN de transferencia derivan de pre-ARNt, algunos de los cuales contienen varias moléculas independientes de ARNt. El corte en el extremo 5′ del ARNt es catalizado por la ribozima ARNasa P; el corte en el extremo 3′ es catalizado por una proteína RNAasa convencional. Posteriormente se añade una terminación CCA al extremo 3′ de muchos ARNt en una fase de maduración postranscripcional. Por último, se modifican algunas bases en determinadas posiciones dentro de la molécula de ARNt. En este ejemplo, los nucleósidos modificados son la dihidrouridina (DHU), la metilguanosina (mG), inosina (I), ribotimidina (T) y pseudouridina (ψ). (B) Estructura de las bases modificadas. La dihidrouridina, ribotimidina y pseudouridina se forman por modificación de las uridinas del ARNt. La inosina y la metilguanosina se forman por la modificación de guanosinas.



ARN y moléculas proteínicas, siendo ambos componentes necesarios para alcanzar el nivel de actividad máximo. En 1983 Sidney Altman y sus colaboradores demostraron que el componente ARN aislado de la ARNasa P es capaz por sí mismo de catalizar el corte de pre-ARNt. En estos experimentos se estableció que la ARNasa P es una **ribozima** —una enzima en la cual el componente catalítico está formado por ARN en vez de por proteínas.

El extremo 3′ de los ARNt se forma por la acción de una ARNasa proteínica convencional, pero el procesamiento de este extremo de la molécula de ARN incluye también una actividad inusual: la adición de una secuencia terminal CCA. Todos los ARNt poseen la secuencia CCA en su extremo 3′. Esta secuencia es el sitio de unión de aminoácidos, por lo que es necesaria para el funcionamiento del ARNt durante la síntesis de proteínas. El CCA terminal está codificado en el ADN de algunos genes de ARNt, pero en otros no lo está y es añadido como un paso más en la maduración del ARNt por una enzima que reconoce y añade el CCA a los ARNt que carecen de esta secuencia.

Otro aspecto inusual de la maduración del ARNt es la amplia modificación que sufren las bases que forman las moléculas de ARNt. Aproximadamente el 10% de las bases de ARNt es alterada para dar una serie de nucleótidos modificados en posiciones específicas de las moléculas de ARNt (véase Fig. 8.43). La función de la mayoría de estas bases modificadas se desconoce, pero algunas desempeñan un importante papel en la síntesis proteínica alterando las propiedades de apareamiento de bases de la molécula de ARNt (véase Cap. 9).

Algunos pre-ARNt, de igual forma que los pre-ARNr de determinados organismos, contienen intrones que son eliminados por corte y empalme (o *splicing*). A diferencia de otras reacciones de corte y empalme, que (como se comenta en la sección relativa al procesamiento del ARNm), el *splicing* de los ARNt está mediado por enzimas proteicas convencionales. Una endonucleasa escinde el pre-ARNt en los puntos de corte para escindir el intrón, seguido de la unión de los exones para formar una molécula de ARNt madura.

Maduración del ARNm en eucariotas

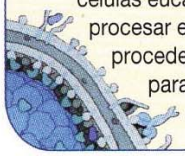
A diferencia de lo que ocurre con la maduración de los ARN ribosómico y de transferencia, la maduración del ARN mensajero presenta importantes diferencias entre células bacterias y eucarióticas. En las bacterias los ribosomas tienen un acceso inmediato al ARNm y la traducción comienza en el ARNm naciente mientras está todavía en marcha la transcripción. En eucariotas el ARNm sintetizado en el núcleo ha de ser transportado al citoplasma antes de ser usado como molde en la síntesis de proteínas. Además, los productos iniciales de la transcripción eucariótica (**pre-ARNm**) son ampliamente modificados antes de salir del núcleo. Durante todo el procesamiento en el núcleo, el transporte al citoplasma, la traducción y la posible degradación, las moléculas de ARNm están asociadas a proteínas para formar partículas de ribonucleoproteínas mensajeras (**RNPm**). Estas proteínas de unión a ARN son responsables del procesamiento de ARNm, el transporte y la regulación de la función del ARNm.

El procesamiento o maduración del pre-ARNm incluye la modificación de ambos extremos de la molécula, así como la eliminación de los intrones de su interior (**Fig. 8.44**). En lugar de tener lugar como sucesos independientes después de la síntesis del pre-ARNm, estas reacciones de maduración están acopladas a la transcripción, de modo que la síntesis del ARNm y la maduración constituyen pasos estrechamente coordinados en la expresión génica. El dominio C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II juega un papel clave en la coordinación de estos procesos, sirviendo como sitio de

ANIMACIÓN 8.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a8.2

Procesamiento del ARN. Las células eucariotas deben procesar el producto de ARN procedente de la transcripción para formar un ARNm maduro y traducible.



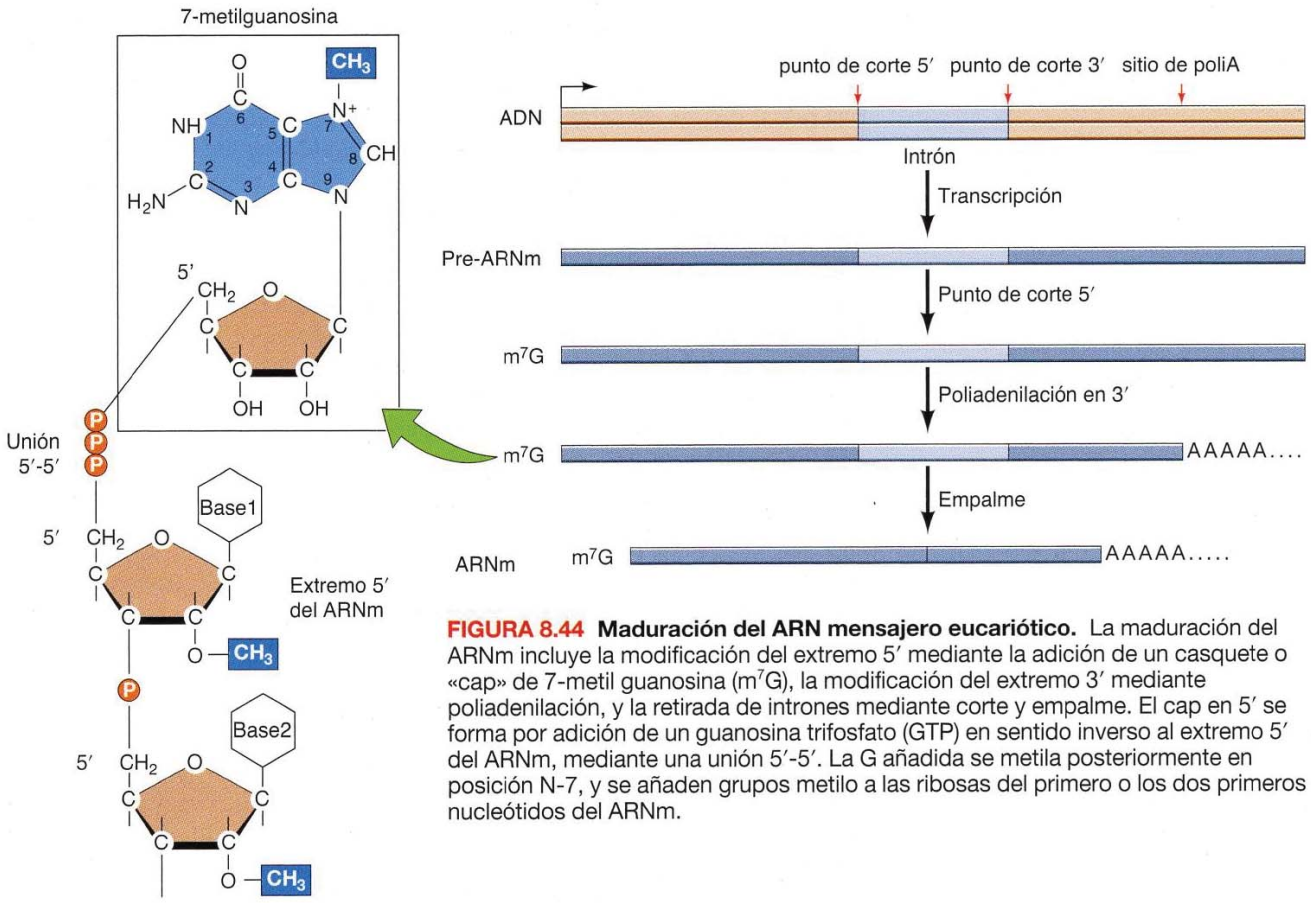


FIGURA 8.44 Maduración del ARN mensajero eucariótico. La maduración del ARNm incluye la modificación del extremo 5′ mediante la adición de un casquete o «cap» de 7-metil guanosina (m^7G), la modificación del extremo 3′ mediante poliadenilación, y la retirada de intrones mediante corte y empalme. El cap en 5′ se forma por adición de un guanosina trifosfato (GTP) en sentido inverso al extremo 5′ del ARNm, mediante una unión 5′-5′. La G añadida se metila posteriormente en posición N-7, y se añaden grupos metilo a las ribosas del primero o los dos primeros nucleótidos del ARNm.

unión para los complejos enzimáticos implicados en la maduración del ARNm. La asociación de estas enzimas de maduración con el CTD de la polimerasa II es responsable de su especificidad en el procesamiento de ARNm; las polimerasas I y II carecen de CTD, de modo que sus productos no son procesados por los mismos complejos enzimáticos.

El primer paso en la maduración del ARNm es la modificación del extremo 5′ del transcrito mediante la adición de una estructura denominada **caperuza o cap de 7-metilguanosina**. Las enzimas responsables de la formación de esta caperuza son reclutadas al CTD fosforilado siguiendo la iniciación de la transcripción, y la caperuza es añadida tras la transcripción de los primeros 20-30 nucleótidos de ARN. La formación de la caperuza es iniciada por la adición de una guanina trifosfata GTP en orientación inversa al nucleótido 5′ terminal del ARN. A continuación se añaden grupos metilo a este residuo de G y a las formas de ribosa de uno o dos nucleótidos 5′ de la cadena de ARN. La caperuza en 5′ estabiliza el ARN, además de alinear los ARNm eucarióticos sobre el ribosoma durante la traducción (Cap. 9).

El extremo 3′ de la mayoría de los ARNm eucarióticos se forma no por la terminación de la transcripción, sino por el corte del transcrito primario y la adición de una **cola de poli-A** —una reacción de la maduración denominada **poliadenilación** (**Fig. 8.45**)—. Las señales para la poliadenilación incluyen un hexanucleótido altamente conservado (AAUAAA en células de mamífero), que está localizado entre 10 y 30 nucleótidos corriente arriba del sitio de poliadenilación, y un elemento de secuencias ricas en U- o GU- corriente abajo. Adicionalmente, algunos genes poseen elementos de secuencias ricas en G-U corriente arriba del motivo AAUAAA. Estas secuencias son reconocidas por un grupo de proteínas, que incluyen una endonucleasa

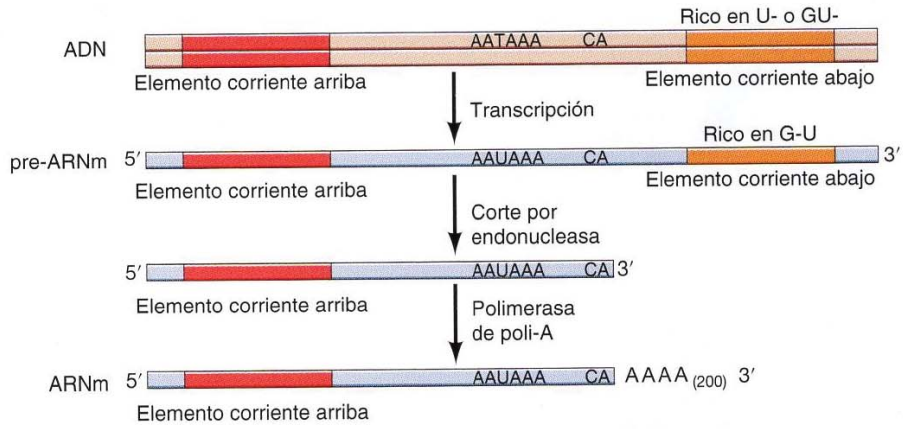


FIGURA 8.45 Formación del extremo 3′ del ARNm eucariótico. Las señales de poliadenilación en células de mamíferos consisten en un hexanucleótido AAUAAA añadido a elementos corriente arriba y abajo (ricos en U-o GU-). Una endonucleasa corta el pre-ARNm a unos 10 a 30 nucleótidos corriente abajo del AAUAAA, habitualmente en una secuencia CA. Posteriormente la polimerasa poli-A añade al extremo 3′ del ARN la cola de poli-A, que está formada por unos 200 nucleótidos de adenina (A).

que corta la cadena de ARN y una poli-A polimerasa que añade una cola de unos 200 nucleótidos al transcrito de ARN. Estas enzimas procesadoras están asociadas con el CTD fosforilado de la ARN polimerasa II, y viajan con la polimerasa desde el punto de iniciación. El reconocimiento de la señal de poliadenilación conduce al fin de la transcripción y la escisión y poliadenilación del ARNm, seguido de la degradación del ARN que fue sintetizado en zonas de la cadena situadas por delante del punto de adición de poli-A.

La mayoría de los ARNm eucarióticos está poliadenilada, y se sabe que las colas de poli-A regulan la traducción y la estabilidad del ARNm. La poliadenilación tiene también un importante papel regulador en fases iniciales del desarrollo, donde cambios en la longitud de las colas de poli-A controlan la traducción del ARNm. Por ejemplo, muchos ARNm están almacenados en óvulos no fertilizados en una forma no traducida con colas cortas de poli-A (habitualmente de 30 a 50 nucleótidos de longitud). La fertilización estimula el alargamiento de las colas de poli-A de los ARNm almacenados, lo cual a su vez activa su traducción y la síntesis de las proteínas necesarias para el desarrollo embrionario.

La modificación más llamativa de los pre-ARNm es la eliminación de intrones por el procedimiento de corte y empalme o *splicing*. Como fue expuesto en capítulos anteriores, las secuencias codificantes de la mayoría de los genes eucarióticos están interrumpidas por secuencias no codificantes (intrones) que son escindidas de forma precisa del ARNm maduro. En mamíferos, la mayor parte de los genes contienen múltiples intrones, que habitualmente cuentan con unas diez veces más de secuencias de pre-ARNm, que los exones. El descubrimiento inesperado de los intrones en 1977 generó un activo esfuerzo investigador dirigido a la compresión de los mecanismos de corte y empalme, que se suponía deberían ser altamente específicos para producir ARNm funcionales. Estudios posteriores de los fenómenos de corte y empalme no sólo han ilustrado nuevos mecanismos de regulación génica, sino que también han revelado la actividad catalítica de ciertas moléculas de ARN y han conducido a la comprensión de cómo se extiende el *splicing* alternativo al repertorio de los genomas de mamíferos.

Mecanismos de corte y empalme o splicing

La clave para entender los mecanismos de corte y empalme fue el desarrollo de sistemas *in vitro* que llevarán a cabo de forma eficiente la reacción (**Fig. 8.46**). Los pre-ARNm fueron sintetizados *in vitro* por medio de la clonación de genes estructurales (con sus intrones) adyacentes a promoto-

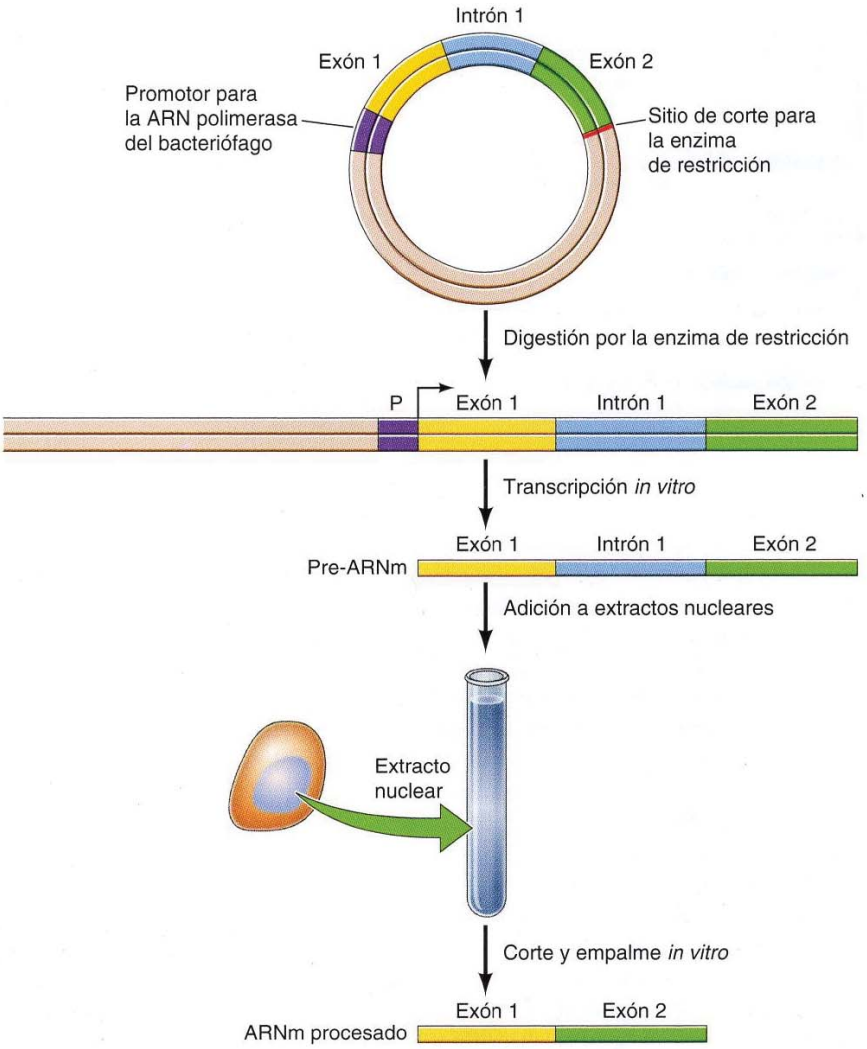


FIGURA 8.46 Corte y empalme *in vitro*. Se procede a la clonación de un gen que contiene un intrón y está situado corriente abajo de un promotor (P), el cual es reconocido por la ARN polimerasa de un bacteriófago. El plásmido es digerido con una enzima de restricción que realiza un corte en el extremo 3′ del gen insertado para conseguir una molécula de ADN lineal. Este ADN se transcribe *in vitro* con la polimerasa del bacteriófago, obteniéndose un pre-ARNm. Las reacciones de corte y empalme pueden ser estudiadas añadiendo *in vitro* este pre-ARNm a extractos nucleares de células de mamíferos.

res de la ARN polimerasa de un bacteriófago en vectores plasmídicos, que pueden ser obtenidos en grandes cantidades. La transcripción de estos plásmidos fue utilizada para obtener un gran número de pre-ARNm que tras ser añadidos a extractos nucleares de células animales fueron cortados y empalmados de forma correcta. El uso de dichos sistemas *in vitro* ha permitido, como en el caso de la transcripción, analizar los fenómenos de corte y empalme con mucho mayor detalle de lo que hubiera sido posible utilizando células intactas.

El análisis de los productos de la reacción y de los intermediarios formados *in vitro* reveló que el corte y empalmado del pre-ARNm tiene lugar en dos etapas (**Fig. 8.47**). En primer lugar el pre-ARNm es cortado en el sitio de corte y empalme 5′, y el extremo 5′ del intrón se une a un nucleótido de ade-

ANIMACIÓN 8.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a8.3

***Splicing* de ADN.** El proceso de *splicing* elimina regiones no codificantes (intrones) del transcrito de ARN y deja únicamente regiones codificantes de proteínas en el ARNm final.

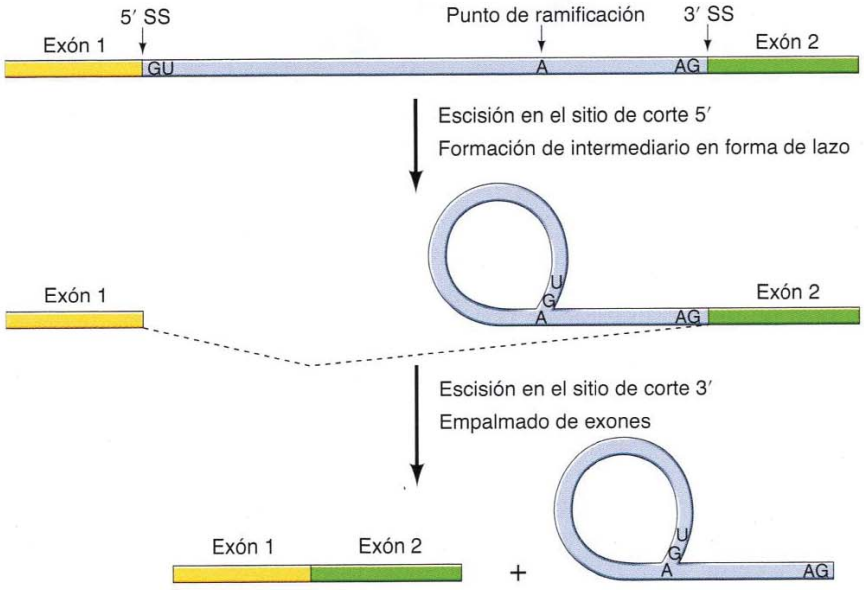


FIGURA 8.47 Corte y empalme del pre-ARNm. El proceso de corte y empalme se lleva a cabo en dos pasos. El primer paso consiste en una escisión en el sitio de corte 5′ (SS) y la unión del extremo 5′ del intrón con una A contenida en el intrón (punto de ramificación). Con esta reacción se consigue un intermediario en forma de lazo, dentro del cual el intrón forma un bucle. El segundo paso es la escisión en el sitio de corte 3′ y el empalmado simultáneo de los exones, obteniéndose por escisión del intrón como una estructura en forma de lazo.

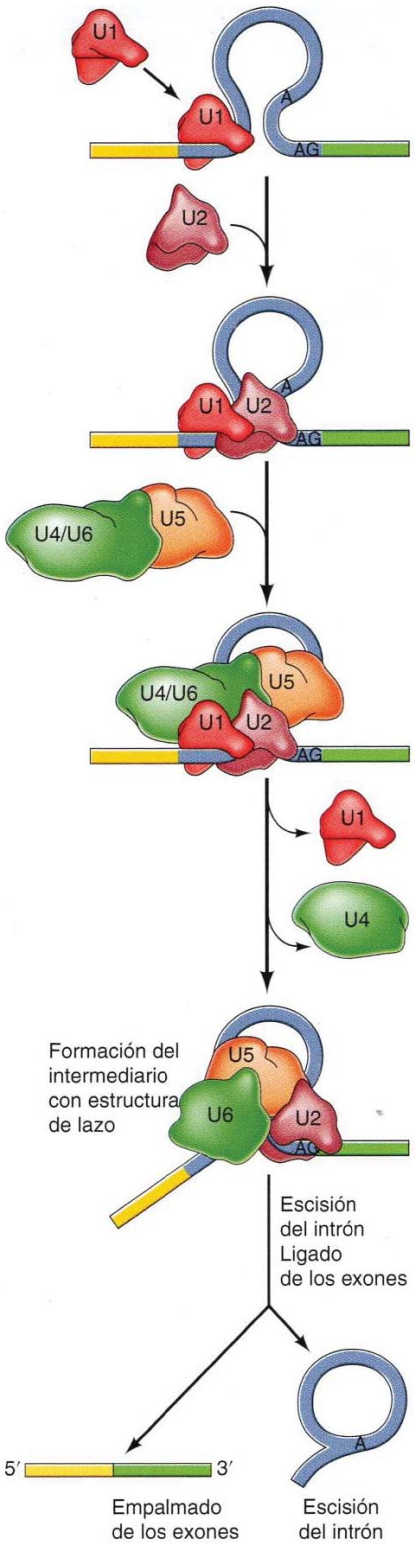
nina del intrón (cerca de su extremo 3′). En este paso se forma un vínculo inusual entre el extremo 5′ del intrón y el grupo hidroxilo 2′ de la adenina. El intermediario resultante es una estructura en lazo, en la que el intrón forma un bucle. El segundo paso tiene lugar con el corte en 3′ y la unión simultánea de los dos exones. El intrón es escindido como una estructura en forma de lazo que es posteriormente degradada en el núcleo de las células intactas.

Estas reacciones definen tres secuencias críticas en los ARNm: la secuencia en el sitio de corte 5′, la secuencia en el sitio de corte 3′ y las secuencias en el punto o sitio de ramificación (el punto en el que se une el extremo 5′ del intrón para formar la estructura en forma de lazo). Los pre-ARNm contienen secuencias consenso similares en cada una de estas tres posiciones, permitiendo al complejo de corte y empalme reconocer a los pre-ARNm y llevar a cabo las reacciones de corte y unión implicadas en el proceso.

El análisis bioquímico de extractos nucleares ha revelado que el *splicing* tiene lugar en grandes complejos, denominados **espliceosomas**, compuestos de proteínas y ARN. Los ARN que forman parte de los espliceosomas son cinco tipos de **ARN nuclear de pequeño tamaño** (**ARNsn**) denominados U1, U2, U4, U5 y U6. Estos ARN, que tienen un tamaño de entre 50 y 200 nucleótidos, forman un complejo con entre seis y diez moléculas proteínicas para dar **partículas pequeñas de rinonucleoproteínas nucleares** (**RNPsn**), que tienen un papel central en el proceso de *splicing*. Las RNPsn U1, U2 y U5 contienen cada una una molécula única de ARNsn, mientras que las RNPsn U4 y U6 están unidas entre sí formando una única RNPsn.

El primer paso en la formación del espliceosoma es la unión de la RNPsn U1 al sitio de corte 5′ del pre-ARNm (**Fig. 8.48**). Este reconocimiento de los sitios de corte 5′ se realiza por medio del apareamiento de bases entre la se-

FIGURA 8.48 Ensamblaje del espliceosoma. El primer paso en el ensamblaje del espliceosoma es la unión del RNPsn U1 al sitio de corte 5′ (SS), seguido de la unión del RNPsn U2 al punto de ramificación. A continuación se incorpora al espliceosoma un complejo preformado que contiene las RNPsn U4/U6 y U5. U4 y U1 se disocian de los espliceosomas y U6 cataliza la formación del producto intermedio en forma de lazo y el ligamiento de los exones.



cuencia del consenso del sitio de corte 5′ y una secuencia complementaria en el extremo 5′ del ARNsn U1 (**Fig. 8.49**). Posteriormente la RNPsn U2 se une al punto de ramificación por apareamiento complementario de bases. Un complejo preformado compuesto de las RNPsn U4/U6 y U5 se incorpora al espliceosoma. La reacción de corte y empalme se acompaña de reordenamientos en los ARNsn con empalme de reacciones catalizadas en U6.

Los ARNsn no sólo reconocen las secuencias consenso en los sitios de ramificación y los sitios de corte en los pre-ARN, sino que también catalizan la reacción de corte y empalme de forma directa. La función catalítica del ARN en el *splicing* se demostró con el descubrimiento de que determinados ARN eran capaces de **autoempalmarse** (*self-splicing*), esto es, eran capaces de catalizar la eliminación de sus propios intrones en ausencia de otras proteínas o ARN. La reacción de autoempalme fue descrita inicialmente por Tom Cech y sus colaboradores en estudios del ARNt 28S del protozoo *Tetrahymena*. Este ARN contiene un intrón de aproximadamente 400 pares de bases que es eliminado de forma precisa tras incubar el pre-ARN en ausencia de proteínas. Estudios posteriores han revelado que el corte y empalme es catalizado por el intrón, que actúa como una ribozima para dirigir su propia escisión de la molécula de pre-ARN. El descubrimiento del autoempalme en el ARNr de la *Tetrahymena*, junto con los estudios acerca de la ARNasa P ya mencionados, han proporcionado la primera demostración de la actividad catalítica del ARN.

Ensayos posteriores han demostrado fenómenos de autoempalme en mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Los ARN con actividad autoempalmante se dividen en clases según su mecanismo de acción (**Fig. 8.50**). El primer paso en el corte y empalme de los intrones de tipo I (p. ej., el pre-ARN de la *Tetrahymena*) es la escisión en el sitio de corte 5′ mediado por un cofactor de guanosina (G). El extremo 3′ del exón liberado reacciona con el sitio de corte 3′ para escindir el intrón como un ARN lineal. Sin embargo, las reacciones de autoempalme de los intrones de tipo II (que está dentro de algún ARNm, ARNr, y los genes ARNt de bacterias, mitocondrias, y cloroplastos) son muy similares al corte y empalme nuclear del pre-ARNm, en el que la escisión del sitio de corte 5′ se sigue de la formación de una estructura (A) con forma de lazo en el intrón, que luego es escindido.

La similitud entre el corte y empalme del pre-ARNm mediado por espliceosomas y el autoempalme de los intrones de tipo II sugirió que los componentes catalíticamente activos del espliceosoma son ARN en vez de proteínas. Esta similitud sugirió en particular que el corte y empalme del pre-ARNm estaba catalizado por los ARNsn del espliceosoma. Estudios posteriores del corte y empalme del pre-ARNm han proporcionado un claro soporte para esta visión, y se sabe que U6 ARNsn cataliza ambos pasos en el corte y empalme del pre-ARNm. El corte y empalme del pre-ARNm es por tanto, considerado como una reacción basada en ARN, catalizada U6 ARNsn del espliceosoma que actúan de forma análoga a los intrones de autoprocesamiento del grupo II. Sin embargo, en el interior de la célula los componentes proteicos de los RNPsn también son necesarios, y participan tanto en el ensamblaje del espliceosoma como en la reacción de corte y empalme.

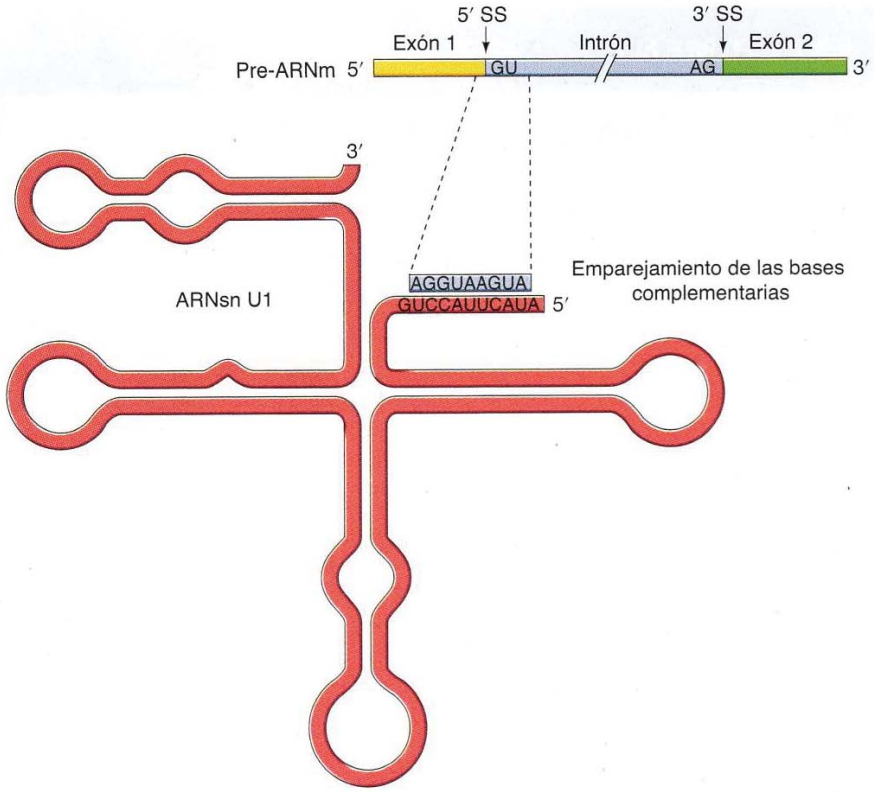


FIGURA 8.49 Unión del ARNsn U1 al sitio de corte 5′. El extremo 5′ del ARNsn U1 se une a las secuencias consenso de los sitios de corte 5′ mediante el apareamiento complementario de bases.

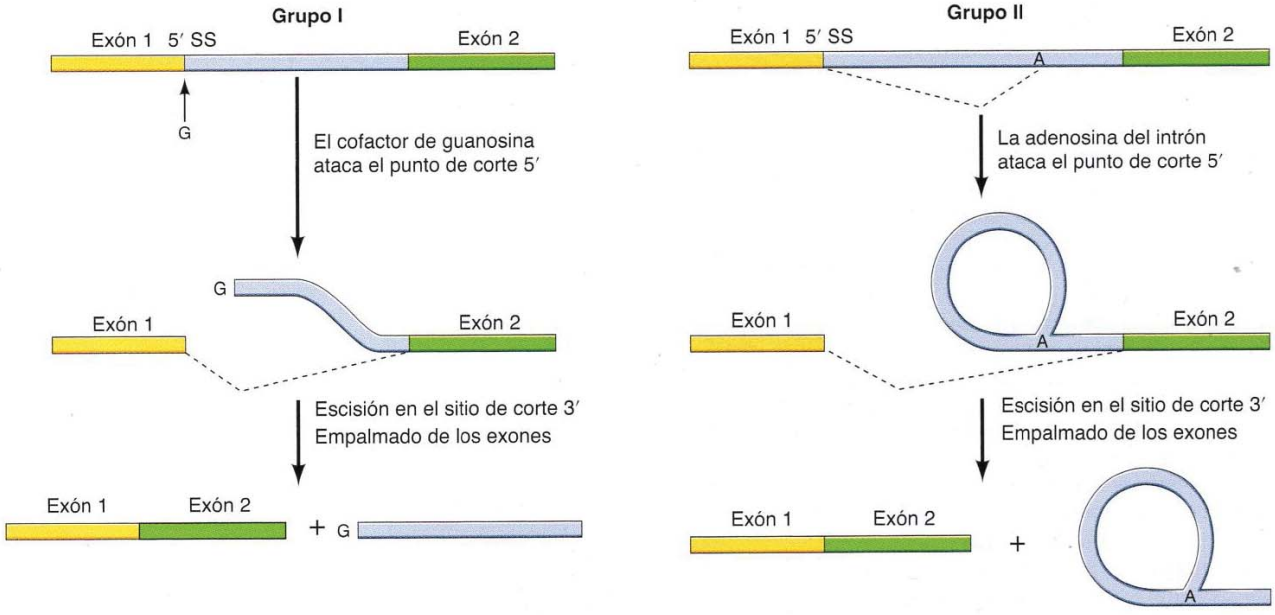
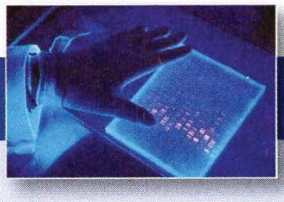


FIGURA 8.50 Intrones autoempalmantes (*self-splicing*). Los intrones autoempalmantes de los grupos I y II se distinguen por sus mecanismos de actuación. En los intrones del grupo I, el primer paso es la escisión en el punto de corte 5′ gracias a la reacción con un cofactor de guanosina. El resultado es un intermediario lineal que tiene una G añadida al extremo 5′ del intrón. En los intrones del grupo II (como en el corte y empalme del pre-ARNm) el primer paso es la escisión en el punto de corte 5′ por reacción con adenosina (A) del interior del intrón, dando lugar a un intermediario con estructura de lazo. En ambos casos el segundo paso es la escisión del sitio de corte 3′ y el simultáneo empalmado de los exones.



EXPERIMENTO CLAVE

Descubrimiento del RNPsn

Los anticuerpos frente a ARN pequeños nucleares que forman complejos con proteínas son producidos por pacientes con lupus eritematoso

Michael R. Lerner y Joan A. Steitz
Yale University, New Haven, Connecticut
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1979,
Volumen 76, págs. 5495-5499

Contexto

El descubrimiento de los intrones en 1977 implicaba que una reacción de maduración totalmente novedosa era requerida para producir ARNm en las células eucarióticas. Los intrones debían ser escindidos con precisión del pre-ARNm, seguido de la unión de los exones para dar lugar a una molécula de ARNm madura. Dada la naturaleza inesperada del *splicing* del ARNm, comprender el mecanismo de la reacción de corte y empalme cautivó la atención de muchos biólogos moleculares. Uno de los principales pasos en la elucidación de este mecanismo fue el descubrimiento de los RNPsn y su implicación en el *splicing* del pre-ARNm.

Los ARN pequeños nucleares fueron identificados por primera vez en las células eucarióticas a finales de los años 60. Sin embargo, la función de los ARNsn permanecía desconocida. En este trabajo de 1979, Michael Lerner y Joan Steitz demostraron que los ARNsn más abundantes estaban presentes formando complejos ARN-proteína denominados RNPsn. Además, proporcionaron la primera sugerencia de que estos complejos ARN-proteína podrían funcionar en el *splicing* del pre-ARNm. Esta identificación de RNPsn llevó a una variedad de experimentos que confirmaron sus papeles y elucidaron el mecanismo por el que tiene lugar el *splicing* del pre-ARNm.

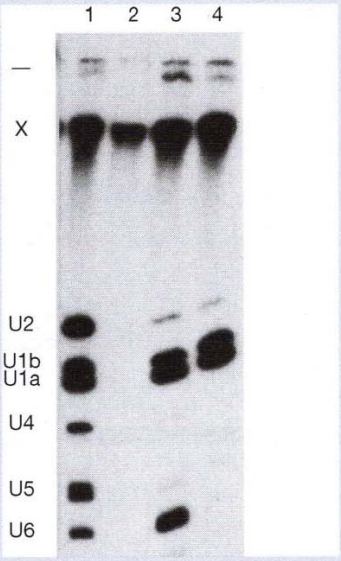
Experimentos

La identificación de los RNPsn se basó en el uso de antisuero de pacientes con lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune en la que los pacientes producen anticuerpos frente a constituyentes celulares normales. Muchos de los anticuerpos producidos por pacientes de lupus eritematoso sistémico están dirigidos frente a componentes del núcleo, incluyendo ADN, ARN e histonas. El descubrimiento de las RNPsn surgió de estudios en los que Lerner y Steitz trataron de caracterizar dos antígenos, denominados ribonucleoproteína (RNP) y Sm, que eran reconocidos por anticuerpos de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Datos indirectos sugirieron que RNP consistía tanto de proteína como de ARN, como su nombre indica, pero ni RNP ni Sm habían sido caracterizados a nivel molecular.

Para identificar los posibles componentes de ARN en los antígenos RNP y Sm, ARN nucleares de células de ratón fueron marcadas con ^{32}P e inmunoprecipitadas con antisuero de diferentes pacientes de lupus eritematoso sistémico (véase Fig. 5.11). Se encontraron seis especies específicas de ARNsn que eran inmunoprecipitadas selectivamente con antisuero de diferentes pacientes, pero no por suero de un paciente control normal (véase figura). El suero anti-Sm inmunoprecipitó a los seis de estos ARNsn, que se designaron U1a, U1b, U2, U4, U5 y U6. El suero anti-RNP sólo inmunoprecipitó U1a y U1b, y el suero de un tercer paciente (que ha sido caracterizado como principalmente anti-RNP) inmunoprecipitó U1a, U1b y U6. Los ARNsn inmunoprecipitados fueron caracterizados mediante análisis de secuencia, que demostró que U1a, U1b y U2 eran idénticos a los ARNsn más abundantes previamente descritos en núcleos de mamíferos, donde U1a y U1b representaban variantes de secuencia de una sola especie de ARNsn de U1 presente en células humanas. Por el contrario, los ARNsn de U4, U5 y U6 fueron identificados por primera vez por Lerner y Steitz en estos experimentos.

Joan Steitz

La inmunoprecipitación de estos ARNsn demostró que eran componentes de complejos ARN-proteína. Se había demostrado previamente que el suero anti-Sm, que inmunoprecipitó los seis ARNsn estaba dirigido frente a un antígeno proteico. De forma similar, se sabía que la proteína era necesaria para el reconocimiento antigénico por parte del suero anti-RNP. Es más, Lerner y Steitz demostraron que ninguno de los ARNsn podían ser inmunoprecipitados si la proteína se eliminaba primero



Inmunoprecipitación de ARNsn con antisuero de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Carril 1, anti-Sm; carril 2, suero control normal; carril 3, antisuero que reconoce principalmente el antígeno RNP; carril 4, anti-RNP. Existe un ARN no específico denominado X en todos los inmunoprecipitados, incluyendo el control.

EXPERIMENTO CLAVE

mediante una extracción del ARN con fenol. Más análisis de las células en las que se habían marcado las proteínas con ^{35}S-metionina identificó a siete proteínas nucleares prominentes que fueron inmunoprecipitadas junto con los ARNsn con los sueros anti-Sm y anti-RNP. Así, estos datos indicaban que cada uno de los seis ARNsn estaba presente en un complejo RNPsn con proteínas nucleares específicas.

Impacto

El descubrimiento de que los ARNsn eran componentes de las RNPsn que eran reconocidos por antisueros específicos abrió un nuevo enfoque para el estudio de la función del ARNsn. Lerner y Steitz indicaron que un posible papel «muy intrigante» para los ARNsn podría ser en el *splicing* de pre-ARNm, y señalizaron que las secuencias próximas al extremo 5′ del ARNsn U1 eran complementarias a los puntos de corte y empalme.

Steitz y sus colaboradores continuaron con una serie de experimentos que estableció la implicación crítica de las RNPsn en el *splicing*. Estos estudios incluyeron un análisis de secuencia más extenso que demostraba la complementariedad de las secuencias conservadas en 5′ del ARNsn U1 a las secuencias consenso de sitios de corte y empalme en 5′, sugiriendo que U1 funcionaba en el reconocimiento del sitio de corte y empalme en 5′. Adicionalmente, el antisuero frente a RNPsn se empleó para demostrar que U1 era necesaria para el *splicing* de pre-ARNm tanto en núcleos aislados como en extractos de corte y empalme *in vitro*. Más estudios han seguido para demostrar que los ARNsn por sí mismos juegan papeles críticos no sólo en la identificación de los sitios de corte y empalme, sino también como catalizadores de la reacción de *splicing*. El descubrimiento inicial de que los ARNsn eran componentes de las RNPsn que podían ser reconocidos por antisueros específicos abrió la puerta a la comprensión del mecanismo de procesamiento del pre-ARNm.

Un cierto número de factores proteicos de *splicing* que no son componentes de las RNPsn, también juegan papeles críticos en el ensamblaje del espliceosoma, especialmente en la identificación de los sitios correctos de corte y empalme en los pre-ARNm. Los pre-ARNm de mamíferos generalmente contienen múltiples exones cortos (una media de 150 nucleótidos en humanos) separados por intrones mucho más largos (una media de 3.500 nucleótidos). Los intrones frecuentemente contienen muchas secuencias parecidas a los puntos de corte y empalme, de modo que la maquinaria de *splicing* debe ser capaz de identificar las dianas 5′ y 3′ de corte y empalme apropiadas en los límites intrón/exón para producir una ARNm funcional. Los factores de corte y empalme sirven para dirigir al espliceosoma a la diana de corte y empalme correcta, mediante la unión a secuencias específicas de ARN en los exones, y reclutando a continuación las RNPsn U1 y U2 a los sitios apropiados del pre-ARNm, mediante interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, los factores de corte y empalme SR se unen a secuencias específicas de los exones y actúan reclutando al snRNP U1 al punto de corte y empalme 5′ (**Fig. 8.51**). Las proteínas SR también interaccionan con otro factor de corte y empalme (U2AF), que se une a las secuencias ricas en pirimidina en los puntos de corte y empalme 3′ y recluta la RNPsn U2 al punto de ramificación. Además de reclutar a los componentes del espliceosoma al pre-ARNm, los factores de corte y empalme acoplan el corte y empalme a la transcripción mediante su asociación con el CTD fosforilado de la ARN polimerasa II. Este anclaje de la maquinaria de corte y empalme a la ARN

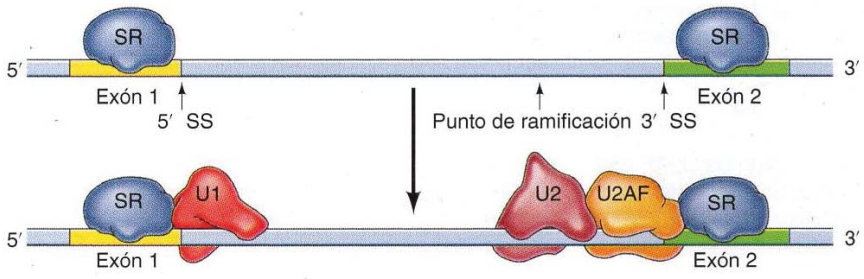


FIGURA 8.51 Papel de los factores de corte y empalme en el ensamblaje del espliceosoma. Los factores de corte y empalme (proteínas SR) se unen a secuencias específicas en los exones. Las proteínas SR reclutan la RNPsn U1 al sitio de corte 5′ y un factor de corte y empalme adicional (U2AF) al punto de corte 3′. A continuación U2AF recluta a RNPsn U2 al punto de ramificación.

polimerasa se cree que es importante para asegurar que los exones se unan en el orden correcto a medida que se sintetiza el pre-ARNm.

◆ Se estima que el corte y empalme aberrante puede causar hasta el 15% de todas las enfermedades hereditarias. Esto incluye patologías como la β-talasemia y diversos tipos de cáncer.

Corte y empalme alternativo

El papel central de los mecanismos de corte y empalme en la maduración del pre-ARNm abre la posibilidad de regular la expresión génica por medio del control de la maquinaria celular que los lleva a cabo. Dado que muchos pre-ARNm contienen múltiples intrones, pueden producirse distintos ARNm partiendo del mismo gen combinando los sitios de corte 5′ y 3′. La posibilidad de combinar los exones aporta un nuevo modo de controlar la expresión génica generando múltiples ARNm (y por tanto múltiples proteínas) a partir del mismo pre-ARNm. Este proceso, denominado **corte y empalme alternativo** (o *splicing* alternativo) ocurre de forma habitual en los genes de eucariotas superiores. Por ejemplo, se calcula que casi todos los genes humanos producen múltiples transcritos que se someten a cortes y empalmes alternativos, obteniéndose hasta varios miles de ARNm de algunos genes. Cada gen humano produce en promedio seis ARNm empalmados alternativamente, cuatro de los cuales codifican proteínas diferentes. Así pues, el corte y empalme alternativo da lugar a un incremento notable de la diversidad de proteínas que pueden ser codificadas por aproximadamente 21.000 genes de los genomas de mamíferos. Puesto que los patrones de corte y empalme alternativos pueden variar entre los distintos tejidos y en respuesta a señales extracelulares, el corte y empalme alternativo proporciona un importante mecanismo de regulación de la expresión génica con especificidad tisular y del desarrollo.

Un ejemplo bien estudiado del procesamiento alternativo específico de tejidos lo proporciona la determinación del sexo en *Drosophila*, donde el corte y empalme alternativo del mismo pre-ARNm determina si la mosca es macho o hembra (**Fig. 8.52**). El corte y empalme alternativo del pre-ARNm de un gen denominado *transformador (tra)* está controlado por una proteína

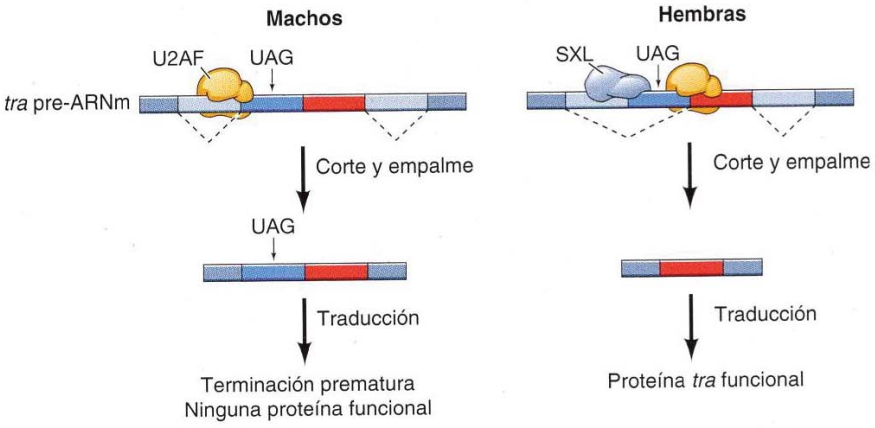


FIGURA 8.52 Corte y empalme alternativo en la determinación sexual de *Drosophila*. El corte y empalme alternativo del pre-ARNm *transformador (tra)* está regulado por la proteína SXL, que sólo se expresa en las moscas hembra. En los machos, el primer exón del ARNm *tra* se une a un punto de corte y empalme 3′ que da lugar a un segundo exón que contiene un codón de terminación para la traducción (UAG), de modo que no se expresa ninguna proteína *tra*. En las hembras, la unión de la proteína SXL bloquea la unión de U2AF a este punto de corte y empalme 3′, resultando en el uso de un sitio alternativo más adelante en el exón 2. Este punto de corte y empalme alternativo en 3′ se encuentra después del codón de terminación para la traducción, de modo que el ARNm expresado en las hembras dirige la síntesis de una proteína *tra* funcional.

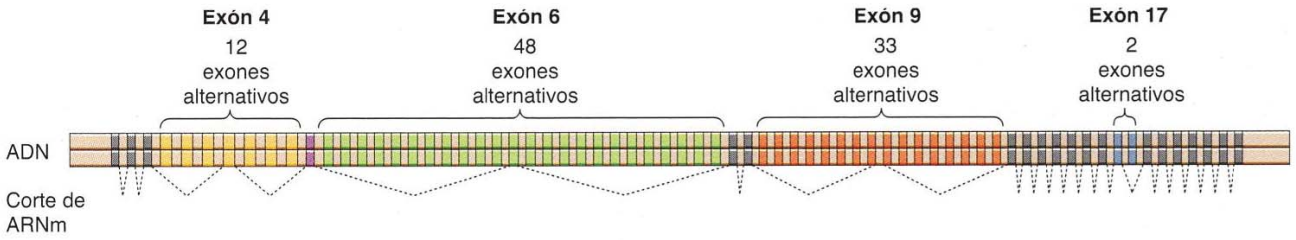


FIGURA 8.53 Corte y empalme alternativo de *Dscam*. El gen *Dscam* (que codifica la proteína de superficie celular de *Drosophila Dscam*). contiene cuatro juegos de exones alternativos: 12 para el exón 4, 48 para el exón 6, 33 para el exón 9, y 2 para el exón 17. Cualquier exón de cualquiera de estos juegos puede ser incorporado en el ARNm madura, de forma que el corte y empalme alternativo puede producir un total de 38.016 ARNm diferentes ($12 \times 48 \times 33 \times 2 = 38.016$). En las líneas de puntos se ilustra un patrón de *splicing* alternativo.

(SXL) que sólo se expresa en las moscas hembra. El pre-ARNm *transformador* posee tres exones, pero un segundo exón distinto entre ambos sexos se incorpora en el ARNm como resultado del uso de puntos de corte y empalme alternativos en 3′. En los machos, el exón 1 se une al sitio de corte y empalme situado más corriente arriba de estos sitios 3′, que es seleccionado mediante la unión del factor de corte y empalme U2AF. En las hembras, la proteína SXL se une al sitio de corte y empalme 3′, bloqueando la unión de U2AF. Como consecuencia, el sitio de corte y empalme corriente arriba se salta en las hembras, y el exón 1 se une a un sitio de corte y empalme 3′ alternativo que se encuentra corriente abajo. Las secuencias del exón 2 incluídas en el ARNm *transformador* contienen un codón de terminación de la traducción (UAG), de modo que no se produce ninguna proteína. Este codón de terminación no está incluido en el ARNm femenino, de modo que las moscas hembra expresan la proteína *transformadora* funcional, que actúa como un regulador clave en la determinación del sexo.

◆ El oído de un mamífero contiene células pilosas que están preparadas para responder a sonidos de diferentes frecuencias. Se cree que este fenómeno está mediado en parte por el corte y empalme alternativo de un gen que codifica una proteína canal.

El corte y empalme alternativo de *transformador* ilustra la acción de un represor (la proteína SXL) que funciona bloqueando la unión de un factor de corte y empalme (U2AF), y un gran grupo de proteínas regulan de forma similar el corte y empalme mediante la unión a secuencias silenciadoras de los pre-ARNm. En otros casos, el corte y empalme alternativo está controlado por activadores que reclutan los factores de corte empalme para que actúe sobre sitios que de otro modo no serían reconocidos. Los activadores de corte y empalme mejor estudiados son los miembros de la familia de proteínas SR (véase Fig. 8.51), que se unen a secuencias específicas potenciadoras del corte y empalme.

Por tanto, existen múltiples mecanismos que regulan el corte y empalme alternativo, y variaciones en el corte y empalme alternativo constituyen una importante contribución a la diversidad de las proteínas expresadas durante el desarrollo y la diferenciación. Uno de los ejemplos más llamativos es el corte y empalme alternativo de una proteína de la superficie celular de *Drosophila* (denominada *Dscam*) que está implicada en especificar conexiones entre neuronas. El gen *Dscam* contiene cuatro juegos de exones alternativos, de forma que un solo exón de cada juego se incorpora en el ARNm (**Fig. 8.53**). Estos exones pueden unirse en cualquier combinación, de forma que el corte y empalme alternativo puede potencialmente generar 38.016 ARNm y proteínas diferentes a partir de este único gen: más del doble del número total de genes del genoma de *Drosophila*. En algunos trabajos recientes se ha publicado que estas formas escindidas alternativas de *Dscam* aportan un código de identidad a cada neurona que es imprescindible para

la creación de conexiones entre las neuronas necesarias para el desarrollo del cerebro de la mosca.

Corrección del ARN

La **correción del ARN** (o en inglés *RNA editing*) se define como los procesos de maduración (aparte del corte y empalme) que alteran las secuencias codificadoras de proteínas de algunos ARNm. Esta inesperada forma de maduración de ARN fue descrita por primera vez en ARNm mitocondriales de tripanosomas, en los que se añadían y eliminaban residuos de U en múltiples sitios junto con el pre-ARNm para generar el ARNm. Más recientemente, la corrección ha sido descrita en ARNm mitocondriales de otros organismos, ARNm cloroplásticos de plantas superiores y ARNm nucleares de genes animales.

La corrección de ARNm nucleares animales, así como de ARN mitocondriales y cloroplásticos de plantas superiores, implica cambios de bases únicos como resultado de reacciones de modificación de bases similares a las que ocurren en la maduración de ARNt. En células animales las reacciones de corrección incluyen la desaminación de citosina a uridina y de adenosina a inosina. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la corrección del ARNm de la apolipoproteína B, que transporta lípidos en la sangre. En este caso, la corrección con especificidad tisular del ARN da lugar a la producción de dos formas distintas de apolipoproteína B (**Fig. 8.54**). La Apo-B100 humana (4.536 aminoácidos) se sintetiza en el hígado por medio de la traducción del ARNm sin editar. Sin embargo, tras la traducción a nivel intestinal de un ARNm corregido en el que una C es transformada en una U por desaminación se obtiene una proteína más corta (Apo-B48, 2.152 aminoácidos). Esta alteración cambia el codón para glutamina (CAA) por un codón de terminación de la traducción (UAA) en el ARNm corregido, llevando a la síntesis de una proteína Apo-B más corta. La corrección con especificidad tisular del ARNm de la Apo-B lleva a la expresión de proteínas distintas desde un punto de vista estructural y funcional en el hígado e intestino. La Apo-B100 producida por el hígado transporta lípidos en el torrente sanguíneo; la Apo-B48 interviene en la absorción de lípidos de origen dietético en el intestino.

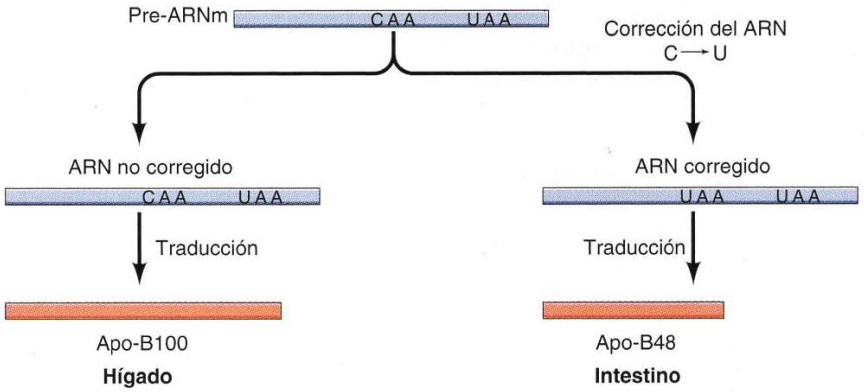


FIGURA 8.54 Edición del ARNm de la apolipoproteína B. En el hígado humano se traduce un ARNm no corregido, obteniéndose una proteína de 4.536 aminoácidos llamada Apo-B100. En el intestino humano, por el contrario, se corrige este ARNm mediante una modificación de bases que sustituye una C determinada por un U. Esta modificación transforma el codón de glutamina (CCA) en un codón de terminación (UAA), por lo que la síntesis proteínica se acorta dando lugar a la Apo-B48, con 2.152 aminoácidos.

La corrección del ARN por la deaminación de la adenosina en inopina es la forma más común de corrección nuclear del ARN en mamíferos. Este modo de corrección juega un papel importante en el sistema nervioso, donde la corrección de A-a-I resulta en cambios sencillos de aminoácido en los receptores para algunas moléculas señalizadoras en la superficie de las neuronas. Por ejemplo, los ARNm que codifican receptores del neurotransmisor serotonina pueden ser editados en hasta cinco sitios, potencialmente generando 24 versiones diferentes del receptor con diferentes actividades señalizadoras. La importancia de la edición A-a-I en el sistema nervioso se demuestra adicionalmente por el descubrimiento de que mutantes de *C. elegans*, *Drosophila* y ratones que carecen de la enzima editora sufren una diversidad de defectos neurológicos. Recientemente, los estudios de secuenciación del genoma completo coinciden en indicar que la corrección del ARN podría ser mucho más frecuente de lo que suele pensarse, afectando normalmente a secuencias no codificadoras en intrones o regiones no traducidas que codifican secuencias en ARNm de mamíferos.

Degradación del ARN

Los pasos de maduración analizados en la sección previa resultan en la formación de ARNm maduros, que entonces son transportados al citoplasma, donde funcionan dirigiendo la síntesis de proteínas. Sin embargo, la mayoría de las secuencias transcritas en pre-ARNm son degradadas en el interior del núcleo. Más del 90% de las secuencias de los pre-ARNm son intrones, que son degradados en el interior del núcleo después de su escisión por corte y empalme. Esto es llevado a cabo por una enzima que reconoce el enlace 2′-5′ característico formado en el punto de ramificación, además de por enzimas que reconocen extremos 5′ o 3′ de las moléculas de ARN y catalizan la degradación de ARN en cualquier dirección. Los extremos 5′ y 3′ de los ARNm maduros están protegidos de esta maquinaria de degradación por la presencia de caperuzas y poliadenilación, respectivamente, mientras que los extremos no protegidos de los intrones son reconocidos y degradados.

Además de degradar intrones, las células poseen un sistema de control de calidad que detectan y degradan ARNm aberrantes generados por error en el transcurso de la transcripción. El mecanismo de control mejor estudiado es el **decaimiento de ARNm mediado sin sentido**, que provoca la degradación de ARNm que carecen de marcos completos de lectura abierta. Este mecanismo suprime moléculas aberrantes de ARNm y evita la síntesis de proteínas truncadas anómalas. El decaimiento de ARNm mediado sin sentido se pone en marcha cuando los ribosomas detectan codones de terminación prematuros, identificados como codones de finalización que se producen más de 50 nucleótidos por delante de una unión exón-exón en ARNm sometidos a corte y empalme. La presencia de esos codones de finalización prematura detiene la traducción y conduce a la degradación de los ARNm defectuosos.

Lo que podría considerarse como el aspecto final de la maduración de una molécula de ARN es su eventual degradación en el citoplasma. Puesto que el nivel intracelular de ARN está determinado por un equilibrio entre la síntesis y la degradación, la tasa de degradación de ARN individuales es otro nivel al que puede controlarse la expresión génica. Tanto los ARN ribosómicos como los de transferencia son muy estables, y esta estabilidad es la principal responsable de los niveles elevados de estos ARN (superior al 90% de todo el ARN) tanto en células procarióticas como eucarióticas. Por el contrario, los ARNm bacterianos se degradan rápidamente, poseyendo generalmente una vida media de tan sólo 2 a 3 minutos. Esta rápida renovación de ARNm bacterianos permite a la célula responder rápidamente a

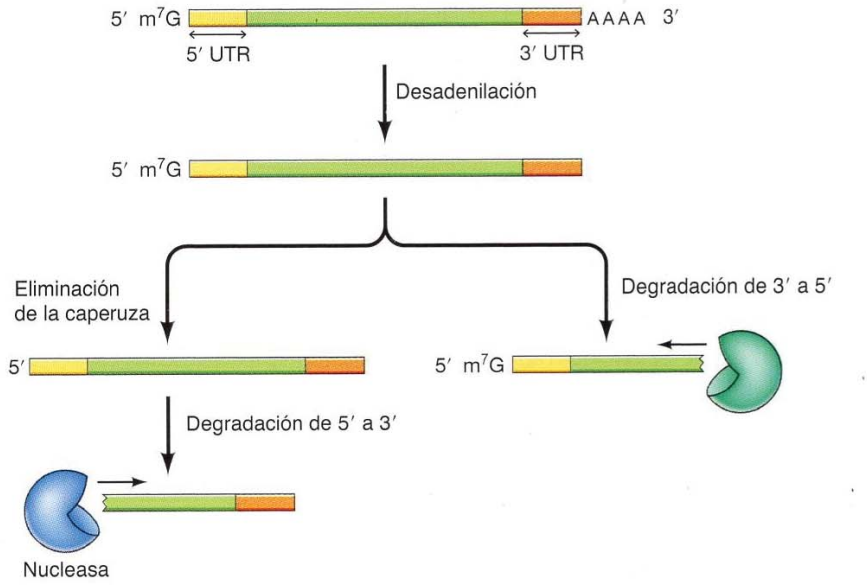


FIGURA 8.55 Degradación del ARNm. La degradación del ARNm suele comenzar con el acortamiento de la cola de poli-A (desadenilación), lo que se sigue de la eliminación de la caperuza de 5′ del extremo 5′ (degradación de 5′ a 3′) o bien de la degradación del extremo 3′ (degradación de 3′ a 5′).

modificaciones en su entorno, como cambios en la disponibilidad de nutrientes requeridos para el crecimiento.

No obstante, en las células eucarióticas las distintas moléculas de ARNm se degradan a una velocidad diferente, lo que crea otro parámetro de regulación de la expresión génica en eucariotas. Las vidas medias de los ARNm en las células de mamífero varían desde 30 minutos hasta unas 20 horas. Los ARNm inestables suelen codificar proteínas reguladoras, como factores de transcripción, cuyas concentraciones intracelulares cambian con rapidez como respuesta a estímulos ambientales. Por el contrario, los ARNm que codifican proteínas estructurales suelen tener vidas medias más largas.

La degradación citoplasmática de la mayoría de los ARNm eucarióticos comienza con el acortamiento de sus colas poli-A (**Fig. 8.55**). A continuación, estos ARNm desadenilados son degradados por nucleasas que actúan a partir del extremo 3′ o la eliminación de la caperuza en 5′. Con frecuencia, los ARN degradados con rapidez contienen secuencias específicas ricas en AU cerca de sus extremos 3′ que actúan como sitios de unión de proteínas que pueden estabilizar estos ARNm o bien marcarlos para inducir su degradación. Las actividades de estas proteínas de unión a ARN se regulan por medio de señales extracelulares, como factores de crecimiento y hormonas, de modo que las células son capaces de controlar las velocidades de degradación de ciertos ARNm como respuesta a las condiciones ambientales. Además, la degradación de muchos ARNm está regulada por ARNmi, que estimulan la degradación del ARNm además de inhibir la traducción (descrito en el capítulo 9). Por tanto, a pesar de que la transcripción representa el primer nivel de regulación de la expresión génica, las variaciones de la velocidad de degradación del ARNm juegan un papel destacado en el control de las concentraciones estacionarias de esta molécula en el interior celular.

RESUMEN

Transcripción en bacterias

ARN polimerasa y transcripción: La: ARN polimerasa de *E. coli* consta de subunidades α, β, β', ω y σ. La transcripción se inicia por la unión de σ a las secuencias promotoras. Tras la síntesis de los primeros nucleótidos del ARN, el núcleo de la polimerasa se separa de σ y viaja a lo largo del molde de ADN a medida que alarga la cadena de ARN. La transcripción continúa hasta que la polimerasa encuentra una señal de terminación.

Ver Animación 8.1 y Vídeo 8.1

PALABRAS CLAVE: **ARN polimerasa, promotor**

Represores y control negativo de la transcripción: El prototipo de regulación génica en bacterias es el operón *lac*, controlado por la unión de un represor a secuencias específicas del ADN cercanas al promotor.

operón, operador, represor, elemento de control *cis*-actuante

Control positivo de la transcripción: Algunos genes bacterianos son regulados mediante activadores transcripcionales en vez de represores.

ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales

ARN polimerasas eucarióticas: Las células eucarióticas contienen tres ARN polimerasas nucleares distintas, que transcriben genes que codifican ARNm, ARNmi y ARNlnc (polimerasa II), ARNr (polimerasas I y II) y ARNt (polimerasa III).

Factores de transcripción generales e iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II: Las ARN polimerasas eucarióticas no se unen directamente a las secuencias promotoras; necesitan proteínas adicionales (factores de transcripción generales) para iniciar la transcripción. Las secuencias promotoras de genes transcritos por la ARN polimerasa II son reconocidas por el factor general de transcripción TFIID que incorpora a otros factores de transcripción y a la ARN polimerasa al promotor.

factor de transcripción, factor de transcripción general, secuencia TATA, proteína de unión a TATA (TBP), factor asociado a TBP (TAF), Mediador

Transcripción por las ARN polimerasas I y III: Las ARN polimerasas I y III también necesitan factores de transcripción adicionales para unirse a los promotores de los genes de ARNr, ARNt y ARNsn.

Regulación de la transcripción en eucariotas

Secuencias reguladoras de acción en* cis: *Promotores y estimuladores: La transcripción de genes eucarióticos está controlada por proteínas que se unen a secuencias reguladoras, las cuales pueden estar localizadas a cientos de kb del sitio de inicio de la transcripción. Los estimuladores contienen de forma característica sitios de unión para múltiples proteínas que actúan conjuntamente en la regulación de la expresión génica.

estimuladores, aislador, *topologically associating domain* (TAD), CTCF

Sitios de unión para factores de transcripción: Los factores de transcripción eucariotas se unen a secuencias cortas de ADN, generalmente de 6-10 pares de bases, presentes en promotores o en secuencias potenciadoras (*enhancers*).

ensayo de variación de la movilidad electroforética, inmunoprecipitación cromática

Proteínas reguladoras de la transcripción: Se han aislado muchos factores transcripcionales eucarióticos gracias a su unión a secuencias específicas de ADN.

cromatografía de afinidad al ADN

Estructura y función de los activadores transcripcionales: Los activadores transcripcionales son proteínas modulares que contienen dominios diferentes de unión al ADN y de activación. Los dominios de unión al ADN median la asociación con secuencias reguladoras específicas; los dominios de activación estimulan la transcripción interaccionando con proteínas mediadoras y con factores de transcripción generales, además de con coactivadores que modifican la estructura cromatínica.

activador transcripcional, dominio en dedos de cinc, receptor de hormona esteroidea, hélice-giro-hélice, homeodominio, cremallera de leucinas, hélice-bucle-hélice, coactivador

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Represores eucarióticos: La expresión génica en células eucarióticas está regulada tanto por represores como por activadores. Algunos represores interfieren en la unión de activadores o factores de transcripción generales al ADN. Otros represores contienen dominios de represión que inhiben la transcripción interaccionando con factores de transcripción generales, activadores transcripcionales, o correpresores que afectan a la estructura cromatínica.

correpresor

Regulación de la elongación: La transcripción se regula tanto al nivel de la elongación como de la iniciación. En muchos genes, las moléculas de polimerasa II que han comenzado a transcribirlos se han detenido poco después del promotor. Estas polimerasas detenidas reanudarán la transcripción tan pronto como reciba las señales extracelulares adecuadas.

Cromatina y epigenética

Modificación de histonas: La modificación de histonas se encuentra estrechamente ligada a la regulación transcripcional. Las enzimas que catalizan la acetilación de las histonas están asociadas con los factores de transcripción, mientas que las histona deacetilasas están asociadas con represores. Las histonas también se ven modificadas por fosforilación y metilación, y modificaciones específicas de las histonas afectan a la expresión génica sirviendo como sitios de unión para otras proteínas reguladoras. Distintos patrones de la modificación de histonas marcan los promotores y los estimuladores.

acetilación de histonas, sitio hipersensible a DNase

Ver Vídeo 8.2

Factores remodeladores de la cromatina: Los factores remodeladores de la cromatina facilita la unión de los factores de transcripción del ADN por alterar el orden de las estructuras de los nucleosomas.

factor de remodelación de cromatina

Histonas y herencia epigenética: La modificación de histonas es un mecanismo importante de la herencia epigenética.

herencia epigenética, proteínas Polycomb

Metilación del ADN: La metilación de los residuos de citosina puede inhibir la transcripción de genes eucariotas y es importante para el silenciamiento de los elementos transponibles. La regulación de la expresión génica mediante metilación desempeña un importante papel en la impresión genómica, que controla la transcripción de algunos genes relacionados con el desarrollo de mamíferos.

impresión genómica

ARN no codificantes: Se ha identificado un número importante de ARN largos no codificantes (ARNlnc), muchos de los cuales pueden actuar como reguladores transcripcionales. Numerosos ARNlnc actúan mediante la formación de complejos con proteínas que regulan la modificación de cromatina y el reclutamiento de estos complejos en sus genes diana.

ARN largo no codificante (ARNlnc)

Maduración y renovación del ARN

Maduración de los ARN ribosómico y de transferencia: Los ARN ribosómico y de transferencia proceden del corte de un largo transcrito primario, tanto en células bacterianas como eucarióticas. En los ARNr se añaden grupos metilo, y se modifican varias bases en los ARNt.

pre-ARNr, pre-ARNt, ARNasa P, ribozima

Maduración del ARNm en eucariotas: Los pre-ARNm eucarióticos se modifican con la adición de casquetes o cap de 7-metilguanosina y colas de poli-A en 3′, además de la extracción de los intrones mediante corte y empalme.

pre-ARNm, RNPm casquete o cap de 7-metilguanosina, cola de poli-A, poliadenilación

Ver Animación 8.2

Mecanismos de corte y empalme: El corte de los pre-ARNm nucleares se lleva a cabo en grandes complejos llamados espliceosomas, formados por proteínas y pequeños ARN nucleares (ARNsn). Los ARNsn reconocen secuencias en los puntos de corte de los pre-ARNm y catalizan la escisión. Algunos ARN mitocondriales, cloroplásticos y bacterianos tienen la habilidad de ser autoempalmantes, ya que el proceso está catalizado por secuencias de los intrones.

espliceosoma, pequeño ARN nuclear (ARNsn), partícula ribonucleica pequeña nuclear (RNPsn), autoempalme

Ver Vídeo 8.3

RESUMEN

Corte y empalme alternativo: Pueden unirse los exones en diferentes combinaciones según sea el tipo de corte y empalmado, lo que supone un importante mecanismo en eucariotas complejos para el control de la expresión génica específica de tejido.

Corrección del ARN: Algunos ARNm son modificados mediante procesos que alteran sus secuencias de codificación de proteínas. La corrección de ARNm mitocondriales en algunos protozoos incluye la adición y delección de residuos de U en múltiples puntos de la molécula. La edición de ADN en las células de mamíferos implica la desaminación de citosina en uridina y de adenosina en uridina.

Degradación del ARN: Los intrones son degradados en el interior del núcleo y los ARNm anómalos que carecen de marcos de lectura abiertos completos son eliminados por decaimiento del ARNm mediado sin sentido. Los ARNm funcionales en las células eucarióticas son degradados a diferentes velocidades, proporcionando un mecanismo adicional de control de la expresión génica. En algunos casos, las tasas de degradación del ARNm están reguladas por señales extracelulares.

PALABRAS CLAVE

corte y empalme alternativo

corrección de ARN

decaimiento de ARNm mediado sin sentido

Preguntas

1. ¿Qué papel juegan los factores sigma (σ) en la síntesis de ARN bacteriano?
2. ¿Cuál es el mecanismo principal de terminación de ARNm de *E. coli*?
3. ¿Cómo influye el represor *lac* en la transcripción del operón *lac*?
4. Está comparando, para la transcripción basal *in vitro*, las necesidades de dos genes de polimerasa II, uno que contiene la secuencia TATA y el otro que tan sólo contiene una secuencia Inr. La transcripción con estos promotores, ¿requiere la presencia de TBP o de TFIID?
5. ¿Cómo difieren los estimuladores o *enhancers* de los promotores como las secuencias de regulación en *cis* en eucariotas?
6. Está estudiando el estimulador de un gen que normalmente sólo se expresa en neuronas. En los modelos en los que este estimulador está ligado a un gen reportero existe expresión en células neuronales pero no en fibroblastos. Sin embargo, si muta un elemento secuencial específico dentro del estimulador, aparece la expresión tanto en células neuronales como en fibroblastos. ¿Qué tipo de proteína reguladora esperaría que se uniera a ese elemento estimulador?
7. ¿Cuál es la función de los aisladores?
8. ¿Cómo actúan los ARNlnc para regular la transcripción?
9. ¿Qué propiedad de Sp1 fue explotada para su purificación mediante cromatografía de afinidad de ADN? ¿Cómo determinarías que la proteína purificada es, efectivamente, Sp1?
10. Has desarrollado una reacción de corte y empalme *in vitro* en el que el ARNm inicial es procesado para dar el ARNm maduro. ¿Qué resultados esperarías si añadieses un antisuero anti-Sm a la reacción?
11. ¿Cómo podrían distinguirse los estimuladores de los promotores en el análisis experimental global?
12. ¿Cuál es la función de los factores de corte y empalme que no son componentes de los RNPsn?
13. ¿Cómo se sintetizan dos formas de apolipoproteína B estructural y funcionalmente diferentes en el hígado e intestino humanos?
14. ¿Qué es el decaimiento mediado por ARNm sin sentido? ¿Cuál es su relevancia en la célula?

Bibliografía

Transcripción en procariotas

Borukhov, S., J. Lee and O. Laptenko. 2005. Bacterial transcription elongation factors: New insights into molecular mechanism of action. *Molec. Microbiol.* 55: 1315–1324. [R]

Gilbert, W. and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 1891–1899. [P]

Jacob, F. 2011. The birth of the operon. *Science* 332:767. [R]

Jacob, F. and J. Monod. 1961. Genetic and regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318–356. [P]

Lawson, C. L., D. Swigon, K. S. Murakami, S. A. Darst, H. M. Berman and R. H. Ebright. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 14: 10–20. [R]

Mathew, R. and D. Chetterji. 2006. The evolving story of the subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol.* 14: 450–455. [R]

Mooney, R. A., S. A. Darst and R. Landick. 2005. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* 20: 335–345. [R]

Murakami, K. S. and S. A. Darst. 2003. Bacterial RNA polymerases: The wholo story. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 13: 31–39. [R]

Ptashne, M. and A. Gann. 2002. Genes and Signals. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rabinowitz, J. D. and T. J. Silhavy. 2013. Systems biology: Metabolite turns master regulator. *Nature* 500: 283–284. [R]

Richardson, J. P. 2003. Loading Rho to terminate transcription. *Cell* 114: 157–159. [R]

Wilson, C. J., H. Zhan, L. Swint-Kruse and K. S. Matthews. 2007. The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64: 3–16. [R]

Zhang, G., E. A. Campbell, E. A., L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98: 811–824. [P]

ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales

Allen, B. L. and D. J. Taatjes. 2015. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 155–166. [R]

Buratowski, S. 2009. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol. Cell* 36: 541–546. [R]

Ebright, R. H. 2000. RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304: 687–698. [R]

Goodrich, J. A. and R. Tjian. 2010. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nature Rev. Genet.* 11: 549–558. [R]

Kim, Y.-J. and J. T. Lis. 2005. Interactions between subunits of *Drosophila* Mediator and activator proteins. *Trends Biochem. Sci.* 30: 245–249. [R]

Kornberg, R. D. 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12955–12961. [R]

Kuehner, J. N., E. L. Pearson and C. Moore. 2011. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 1–12. [R]

Malik, S. and R. G. Roeder. 2010. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nature Rev. Genet.* 11: 761–772. [R]

Matsui, T., J. Segall, P. A. Weil and R. G. Roeder. 1980. Multiple factors are required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255: 11992–11996. [P]

Richard, P. and J. L. Manley. 2009. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* 23: 1247–1269. [R]

Roy, A. L. and D. S. Singer. 2015. Core promoters in transcription: old problem, new insights. *Trends Biochem. Sci.* 40: 165–171. [R]

Russell, J. and J. C. B. M. Zomerdijk. 2005. RNA polymerase I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem. Sci.* 30: 87–96. [R]

Schramm, L. and N. Hernandez. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16: 2593–2620. [R]

Weil, P. A., D. S. Luse, J. Segall and R. G. Roeder. 1979. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18: 469–484. [P]

Regulación de la transcripción en eucariotas

Buecker, C. and J. Wysocka. 2012. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics. *Trends Genet.* 28: 276–284. [R]

De Laat, W. and D. Duboule. 2013. Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes. *Nature* 502: 499–506. [R]

Espinoza, C. A. and B. Ren. 2011. Mapping higher order structure of chromatin domains. *Nature Genet.* 43: 615–616. [R]

Fuda, N. J., M. B. Ardehali and J. T. Lis. 2009. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription *in vivo*. *Nature* 461: 186–192. [R]

Kadonaga, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116: 247–257. [R]

Lonard, D. M. and B. W. O'Malley. 2005. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem. Sci.* 30: 126–132. [R]

Maksimenko, O. and P. Georgiev. 2014. Mechanisms and proteins involved in long-distance interactions. *Front. Genet.* 5:28 [R]

Ong, C.-T. and V. G. Corces. 2014. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nature Rev. Genet.* 15: 234–246. [R]

Price, D. H. 2010. Regulation of RNA polymerase II elongation by c-Myc. *Cell* 141: 399–400. [R]

Shlyueva, D., G. Stampfel and A. Stark. 2014. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nature Rev. Genet.* 15: 272–286. [R]

Cromatina y epigenética

Badeaux, A. I. and Y. Shi. 2013. Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14:211–224. [R]

Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth and C. D. Allis. 1996. *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843–851. [P]

Calo, E. and J. Wysocka. 2013. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell* 49: 825–837. [R]

D'Urso, A. and J. H. Brickner. 2014. Mechanisms of epigenetic memory. *Trends Genet.* 30: 230–236. [R]

Fatica, A. and I. Bozzoni. 2014. Long noncoding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev. Genet.* 15: 7–21. [R]

Guttman, M, J. and 16 others. 2011. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477: 295–300. [P]

Ho, L. and G. R. Crabtree. 2010. Chromatin remodeling during development. *Nature* 463: 474–484. [R]

Holoch, D. and D. Moazed. 2015. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Rev. Genet.* 16: 71–84. [R]

Iyer, M. K. and 18 others. 2015. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genet.* 47: 199–208. [P]

Jones, P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Rev. Genet.* 13: 484–492. [R]

Kugel, J. F. and J. A. Goodrich. 2011. Noncoding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochem. Sci.* 37: 144–151. [R]

Moazed, D. 2011. Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell* 146: 510–518. [R]

Piccolo, F. M. and A. G. Fisher. 2014. Getting rid of DNA methylation. *Trends Cell Biol.* 24: 136–143. [R]

Rinn, J. L. and H. Y. Chang. 2012. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 81: 145–166. [R]

Saha, A., J. Wittmeyer and B. R. Cairns. 2006. Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 437–447. [R]

Schwartz, Y. B. and V. Pirrotta. 2013. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nature Rev. Genet.* 14: 853–864. [R]

Taunton, J., C. A. Hassig and S. L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272: 408–411. [P]

Wang, K. C. and H. Y. Chang. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* 43: 904–914. [R]

Wu, H. and Y. Zhang. 2014. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156: 45–68. [R]

Yang, L., J. E. Froberg and J. T. Lee. 2014. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem. Sci.* 39: 35–43. [R]

Maduración y renovación del ARN

Blanc, V. and N. O. Davidson. 2003. C-to-U RNA editing: Mechanisms leading to genetic diversity. *J. Biol. Chem.* 278: 1395–1398. [R]

Chen, M. and J. L. Manley. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 741–754. [R]

Evans, D., S. M. Marquez and N. R. Pace. 2006. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* 31: 333–341. [R]

Fica, S. M., N. Tuttle, T. Novak, N.-S. Li, J. Lu, P. Koodathingal, Q. Dai, J. P. Staley and J. A. Piccirilli. 2013. RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature* 503: 229–234. [P]

Garneau, N. L., J. Wilusz and C. J. Wilusz. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 113–126. [R]

Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman and D. P. Bartel. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835–841. [P]

Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849–857. [P]

Haugen, P., D. M. Simon and D. Bhattacharya. 2005. The natural history of group I introns. *Trends Genet.* 21: 111–119. [R]

Hundley, H. A. and B. L. Bass. 2010. ADAR editing in double-stranded UTRs and other noncoding RNA sequences. *Trends Biochem. Sci.* 35: 377–383 [R]

Kornblihtt, A. R., I. E. Schor, M. Alló, G. Dujardin, E. Petrillo and M. J. Muñoz. 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 153–165. [R]

Kruger, K., P. J. Grabowski, A. Zaug, A. J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147–157. [P]

Kuehner, J. N., E. L. Pearson and C. Moore. 2011. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 1–12. [R]

Li, J. B. and G. M. Church. 2013. Deciphering the functions and regulation of brain-enriched A-to-I RNA editing. *Nature Neurosci.* 16: 1518–1522. [R]

Mitchell, S. F. and R. Parker. 2014. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell* 54: 547–558. [R]

Nilsen, T. W. and B. R. Graveley. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457–463. [R]

Padgett, R. A., S. M. Mount, J. A. Steitz and P. A. Sharp. 1983. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 35: 101–107. [P]

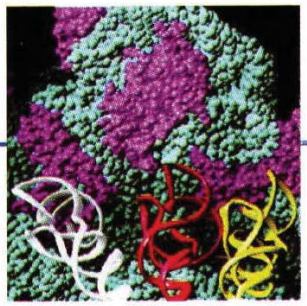
Proudfoot, N. J. 2011. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25:1770–1782.

Richard, P. and J. L. Manley. 2009. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* 23: 1247–1269. [R]

Schmucker, D. 2007. Molecular diversity of Dscam: recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 915–920. [R]

Schoenberg, D. R. and L. E. Maquat. 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Rev. Genet.* 13: 246–259. [R]

Wahl, M. C., C. L. Will and R. Luhrmann. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136: 701–718. [R] template. *Curr. Biol.* 14: R883–R885. [R]



Capítulo 9

Síntesis de proteínas, procesamiento y regulación

Traducción del ARNm 317

Plegamiento y procesamiento de proteínas 338

Regulación de la función de las proteínas 350

Degradación de proteínas, 357

MEDICINA MOLECULAR:
Enfermedad de Alzheimer 342

EXPERIMENTO CLAVE:
El descubrimiento de las tirosina-quinasas 353

A la transcripción y al procesamiento del ARN les sigue la traducción, es decir, la síntesis de proteínas guiada por un molde de ARNm. Las proteínas son los mediadores activos en la mayoría de los procesos celulares, llevando a cabo las funciones determinadas por la información codificada en el ADN genómico. La síntesis de proteínas es la etapa final de la expresión génica. Sin embargo, la traducción del ARNm es sólo el primer paso en la constitución de una proteína funcional. La cadena polipeptídica se debe plegar en una conformación tridimensional adecuada y, con frecuencia, ésta es procesada antes de dar lugar a la forma activa. El procesamiento, especialmente en eucariotas, está muy relacionado con el transporte de las distintas proteínas a su destino final dentro de la célula.

La expresión génica no regula exclusivamente a nivel de la transcripción (véase Cap. 8), sino también al de la traducción, y este control es un elemento destacado de la regulación génica. Sin embargo, un mayor significado tienen los mecanismos que controlan la actividad de las proteínas en la célula. Una vez sintetizadas, la mayoría de las proteínas pueden ser reguladas, en respuesta a señales extracelulares, ya sea por modificaciones covalentes o mediante asociación con otras moléculas en el interior de la célula. Además, el nivel de las proteínas en la célula se regula a través de una degradación de proteínas diferencial. En definitiva, estos sistemas de control de la cantidad y actividad de las proteínas intracelulares regulan todos los aspectos del comportamiento celular.

Traducción del ARNm

Las proteínas se sintetizan a partir de un molde de ARNm mediante un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución (tratado en el Cap. 4). Todos los ARNm se leen en dirección 5′-3′, y las cadenas polipeptídicas se sintetizan desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal. Cada aminoácido viene codificado por tres bases (un codón) en el ARNm, de acuerdo con el carácter casi universal del código genético. El mecanismo fundamental de la síntesis de proteínas es básicamente el mismo en todas las células: la traducción tiene lugar en los ribosomas, siendo los ARNt los adaptadores entre el molde de ARNm y los aminoácidos incorporados a la proteína. La síntesis de proteínas, por tanto, implica la interacción entre tres tipos de moléculas de ARN (el molde de ARNm, ARNt y ARNr) además de varias proteínas necesarias para la traducción.

ARN de transferencia

Durante la traducción, cada uno de los 20 aminoácidos debe ser alineado con su correspondiente codón del ARNm molde. Todas las células contienen distintas moléculas de **ARN de transferencia** que sirven como adaptadores en este proceso. Como es de esperar, dada su función en la síntesis de proteínas, los distintos ARNt presentan una estructura similar. Sin embargo, también poseen secuencias únicas que permiten la unión de un aminoácido concreto con su codón en el ARNm.

Los ARN de transferencia tienen una longitud de aproximadamente 70-80 nucleótidos, con una estructura en forma de hoja de trébol que es debida a la complementariedad de bases entre distintas regiones de la molécula (**Fig. 9.1**). Mediante técnicas de cristalografía de rayos X se ha visto que los distintos ARNt poseen un plegamiento similar, en forma de L, que es necesario para el correcto anclaje a los ribosomas durante la traducción. Los ARNt para actuar como adaptadores necesitan dos regiones distintas y separadas en la molécula. Todos los ARNt poseen una secuencia CCA en su extremo 3′ al cual los aminoácidos se unen covalentemente, en concreto a la ribosa de la adenosina terminal. La secuencia del ARNm es reconocida por el lazo **anticodón**, localizado en el otro extremo de la molécula de ARNt plegada, el cual se une al codón adecuado mediante complementariedad de bases.

La incorporación de los aminoácidos correctos en la proteína depende de la unión de cada uno de ellos a su ARNt, así como de la especificidad del apareamiento de bases entre codón y anticodón. La unión del aminoácido a su ARNt específico es mediado por un grupo de enzimas llamadas **aminoacil ARNt sintetasas**, descubiertas por Paul Zamecnik y Mahlon Hoagland en 1957. Cada una de estas enzimas reconoce un único aminoácido, y también al ARN (o ARNt) de transferencia al cual se debe unir ese aminoácido. La reacción ocurre en dos etapas (**Fig. 9.2**). Primero el aminoácido es activa-

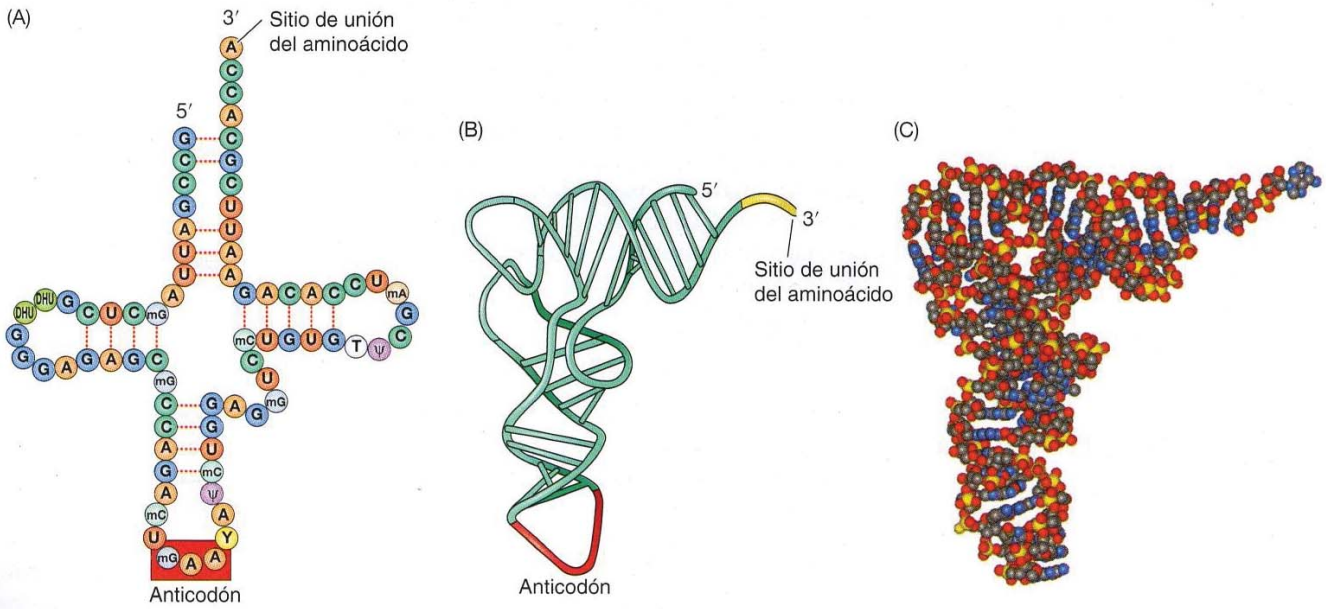


FIGURA 9.1 Estructura de los ARNt. Se ilustra en un modelo abierto en forma de «hoja de trébol» (A) la estructura del ARNt de la fenilalanina de levadura, mostrando la complementariedad de pares de bases. Las bases nitrogenadas modificadas se indican como mG, metilguanosina; mC, metilcitosina; DHU, dihidrouridina; T, ribotimidina; Y, una purina modificada (normalmente adenosina); y ψ, seudouridina. La forma plegada de la molécula se representa en (B) y el modelo tridimensional en (C).

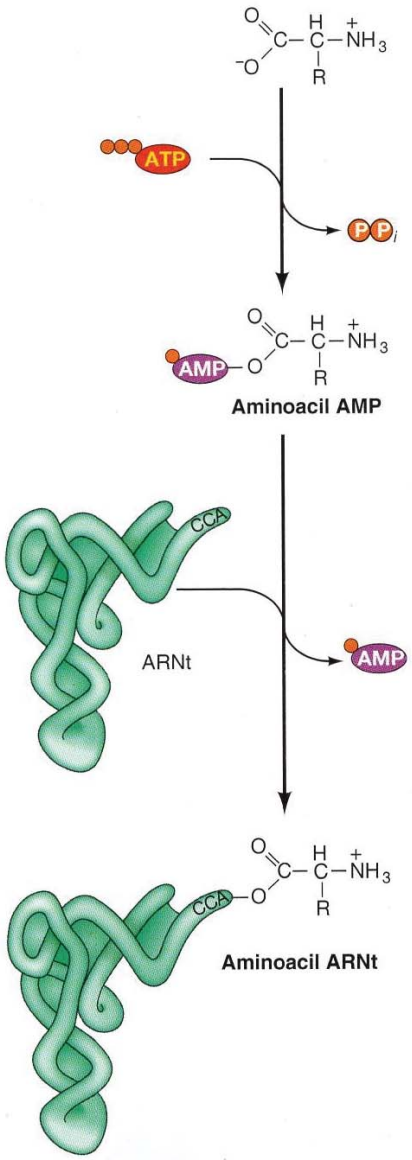


FIGURA 9.2 Unión del aminoácido al ARNt. En la primera reacción, el aminoácido se une al AMP y se forma un intermediario aminoacil AMP. En la segunda reacción, se produce la transferencia del aminoácido al extremo CCA 3' del ARNt aceptor, liberándose el AMP. Las dos reacciones son catalizadas por la aminoacil ARNt sintetasa.

do mediante una reacción con ATP formándose un intermediario aminoacil AMP. Este aminoácido activado se une posteriormente al extremo 3' del ARNt. Las aminoacil ARNt sintetasas deben ser enzimas muy selectivas que reconozcan específicamente tanto los aminoácidos individuales como la secuencia de bases específica en los ARNt aceptores. En algunos casos la alta fidelidad del reconocimiento del aminoácido es debido en parte a una actividad correctora o «lectora de pruebas», por la cual el aminoacil AMP incorrecto es hidrolizado antes de unirse al ARNt en la segunda etapa de la reacción. El reconocimiento del ARNt correcto por la aminoacil ARNt sintetasa también es un proceso muy selectivo: la sintetasa reconoce secuencias de nucleótidos específicas (en la mayor parte de los casos incluye el anticodón) que identifican como única a cada especie de ARNt.

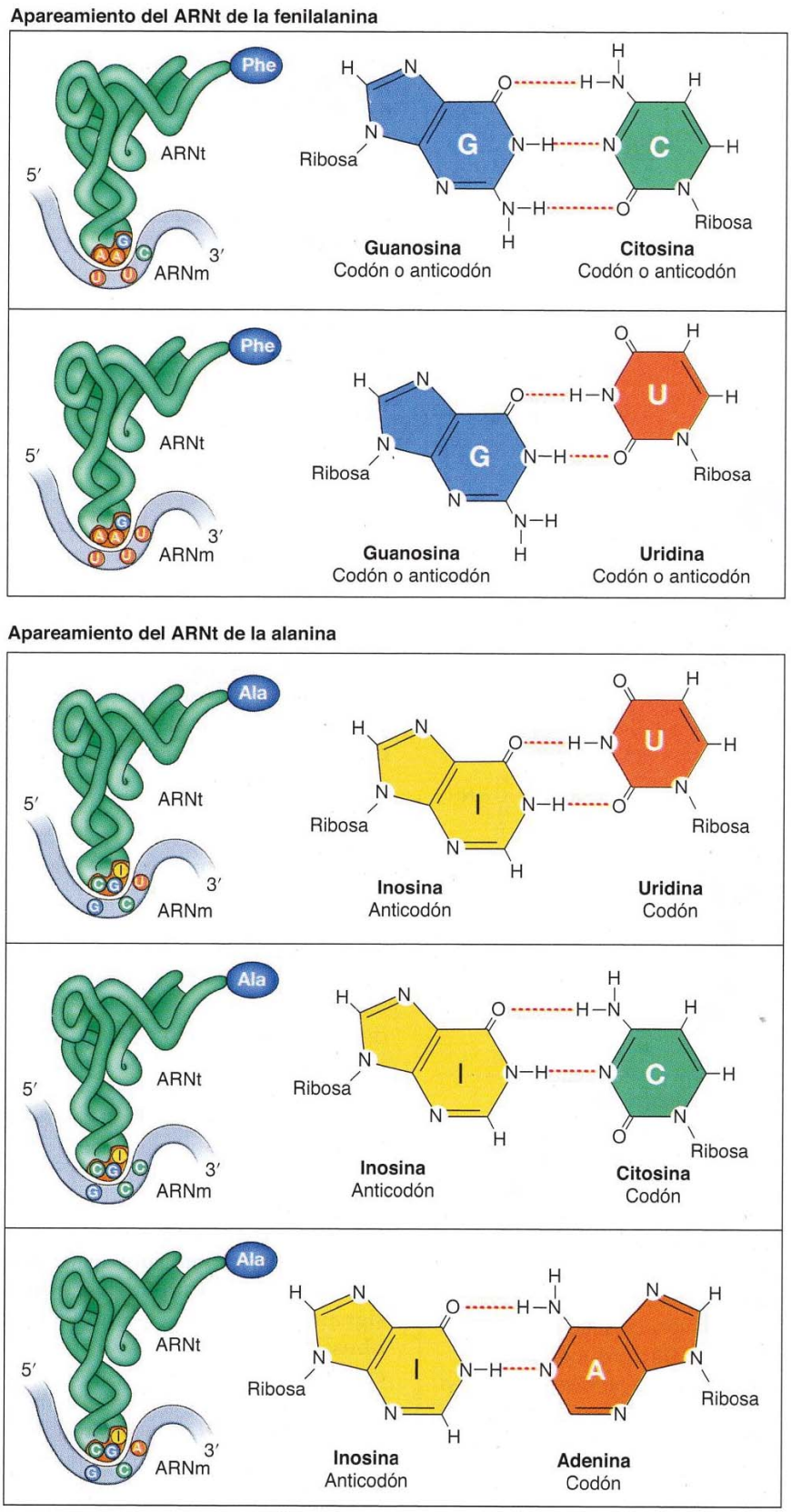
Tras la unión al ARNt, el aminoácido se alinea en el ARNm molde por la complementariedad de bases entre el codón del ARNm y el anticodón del ARNt. Este reconocimiento codón-anticodón es mucho menos estricto que la complementariedad A-U y G-C explicada en capítulos anteriores. El significado de este apareamiento de bases atípico entre el codón y el anticodón está relacionado con la redundancia del código genético. De los 64 codones posibles, tres son codones de terminación de la traducción y los otros 61 codifican para los aminoácidos (véase Tabla 4.1). Esto significa que la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón. Esta redundancia se puede explicar, en parte, por la unión de varios aminoácidos además de una especie de ARNt. *E. coli*, por ejemplo, contiene aproximadamente 40 ARNt diferentes que sirven como aceptores de los 20 aminoácidos distintos. Además, algunos ARNt son capaces de reconocer más de un codón en el ARNm, como resultado de un reconocimiento no estándar (denominado «balanceo») entre el anticodón del ARNt y la tercera posición de algunos codones complementarios (**Fig. 9.3**). En esta posición hay un apareamiento de bases débil debido a la formación de pares de bases G-U y a la sustitución de la guanosina por inosina en los anticodones de muchos ARNt (véase Fig. 8.43). La inosina es una base nitrogenada que puede formar pareja con U, C, o A en la tercera posición del codón, por lo cual si la inosina aparece en el anticodón permite que un único ARNt reconozca tres codones diferentes en la secuencia del mensajero.

◆ En algunos casos, la selenocisteína, que se ha denominado aminoácidos 21, se inserta en los codones stop. La selenocisteína es un aminoácido que contiene selenio que se encuentra en proteínas procedentes de diversos organismos, incluido el ser humano. Otro aminoácido modificado, la pirrolisina, también puede insertarse en los codones stop. La pirrolisina es una lisina modificada que se encuentra en algunas arqueobacterias y que es importante en la producción de metano.

Ribosoma

Los **ribosomas** son el lugar donde se sintetizan las proteínas tanto en células procariotas como eucariotas. Se caracterizaron como partículas subcelulares mediante ultracentrifugación de células lisadas y normalmente se designan de acuerdo con su coeficiente de sedimentación: 70S para los ribosomas procariotas y 80S para los ribosomas de células eucariotas, los cuales son de mayor tamaño. Tanto los ribosomas procariotas como eucariotas están formados por dos subunidades distintas, compuestas por proteínas y por **ARN ribosómicos**. El hecho de que una célula contenga muchos ribosomas refleja la importancia de la síntesis de proteínas en el metabolismo celular. *E. coli*, por ejemplo, contiene aproximadamente 20.000 ribosomas, ocupando cerca del 25% del peso seco de la célula, y las células de mamíferos en continua división contienen aproximadamente 10 millones de ribosomas.

FIGURA 9.3 Apareamiento no estándar entre el codón y el anticodón. El apareamiento de bases en la tercera posición del codón es muy débil; se permite que G se una a U, y que inosina (I) en el anticodón se una a U, C o A. Se muestran dos ejemplos de apareamiento anormal de bases, donde el fenilalanina (Phe) ARNt reconoce los codones UUC o UUU y el alanil (Ala) ARNt reconoce los codones GCU, GCC o GCA.



La estructura general de los ribosomas procariotas y eucariotas es similar, aunque difieren en algunos detalles (**Fig. 9.4**). La subunidad grande de los ribosomas de *E. coli* (designada como 50S) está compuesta por ARNr 23S y 5S, y 34 proteínas; la subunidad pequeña (30S) contiene ARNr 16S y 21 proteínas. Cada ribosómica contiene una única copia de los ARNr y una única copia de cada proteína ribosómica, con una excepción: una proteína de la subunidad 50S está presente en cuatro copias. Las subunidades de los ribosomas eucariotas son de mayor tamaño y contienen más proteínas que sus análogos procariotas. La subunidad grande (60S) de los ribosomas eucariotas consiste en ARNr 28S, 5,8S y 5S, y 46 proteínas; la subunidad pequeña (40S) está compuesta por ARNr 18S y 33 proteínas. Debido a su gran tamaño y complejidad, el análisis estructural de alta resolución de los ribosomas mediante cristalografía de rayos X no se consiguió hasta el año 2000, cuando se describieron por primera vez la estructura de las subunidades 50S y 30S. En 2010 se dilucidó la estructura cristalina de los ribosomas euca-

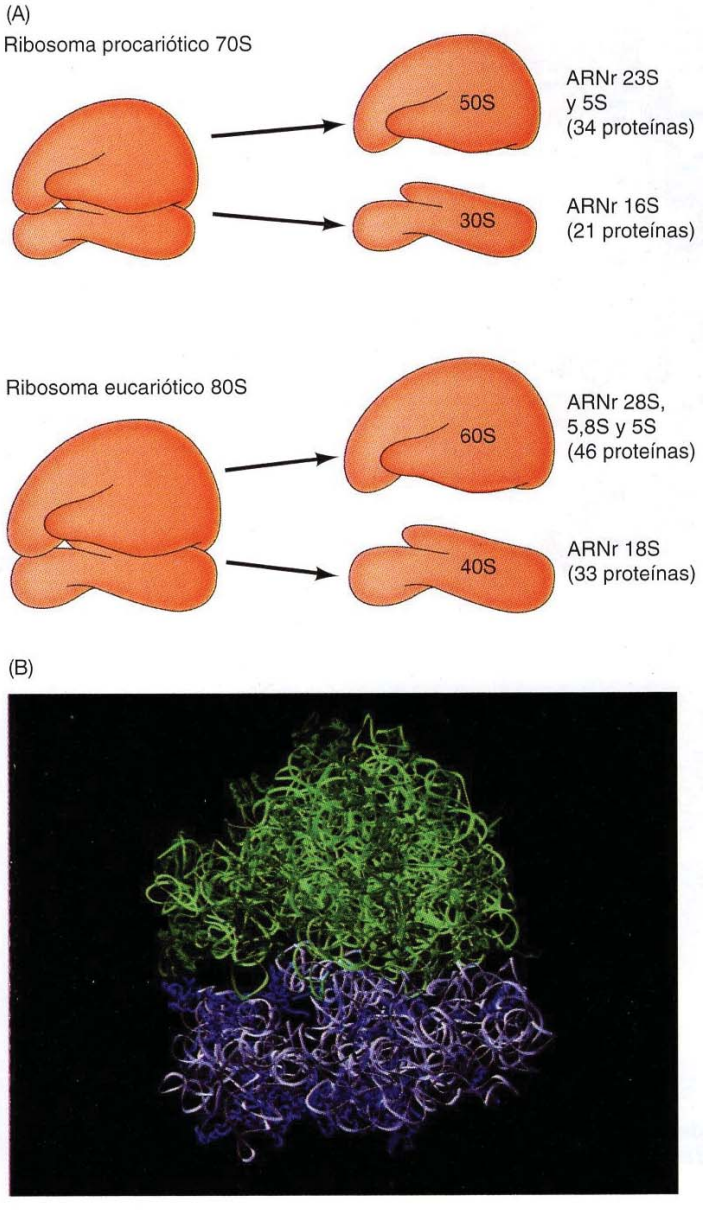


FIGURA 9.4 Estructura ribosómica. (A) Componentes de los ribosomas procarióticos y eucarióticos. Los ribosomas intactos procarióticos y eucarióticos se denominan 70S y 80S, respectivamente, en base a su velocidad de sedimentación durante la ultracentrifugación. Consisten en subunidades mayores y menores, las cuales contienen proteínas ribosómicas y ARNr. (B) Estructura cristalina por rayos X de alta resolución de un ribosoma procariota 70S. La subunidad 30S está en azul (el ARNr es azul claro; las proteínas ribosómicas son de color azul oscuro), y la subunidad 50S, verde (el ARNr es verde claro; las proteínas ribosómicas son verde oscuro). (B, tomado de R. M. Voorhees y cols., 2009. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 528.)

riotas. Como mencionamos a continuación, el descubrimiento de la estructura de los ribosomas a nivel atómico ha afectado enormemente a nuestro conocimiento de la función ribosómica.

Una característica importante de los ribosomas es que se pueden crear *in vitro* por autoensamblaje de sus ARNr y proteínas. Como describió Masayasu Nomura en 1968 por primera vez, las proteínas ribosómicas purificadas y los ARNr pueden mezclarse y, en condiciones adecuadas, formar un ribosoma funcional. Aunque el ensamblaje de los ribosomas *in vivo* (particularmente en las células eucariotas) es considerablemente más complejo, la capacidad de los ribosomas de autoensamblarse *in vitro* proporciona una valiosa herramienta experimental, permitiendo el análisis de las funciones de las proteínas y de los ARN ribosómicos.

Al igual que los ARNt, los ARNr forman estructuras secundarias características debido a la complementariedad de bases (**Fig. 9.5**). Los ARNr aso-

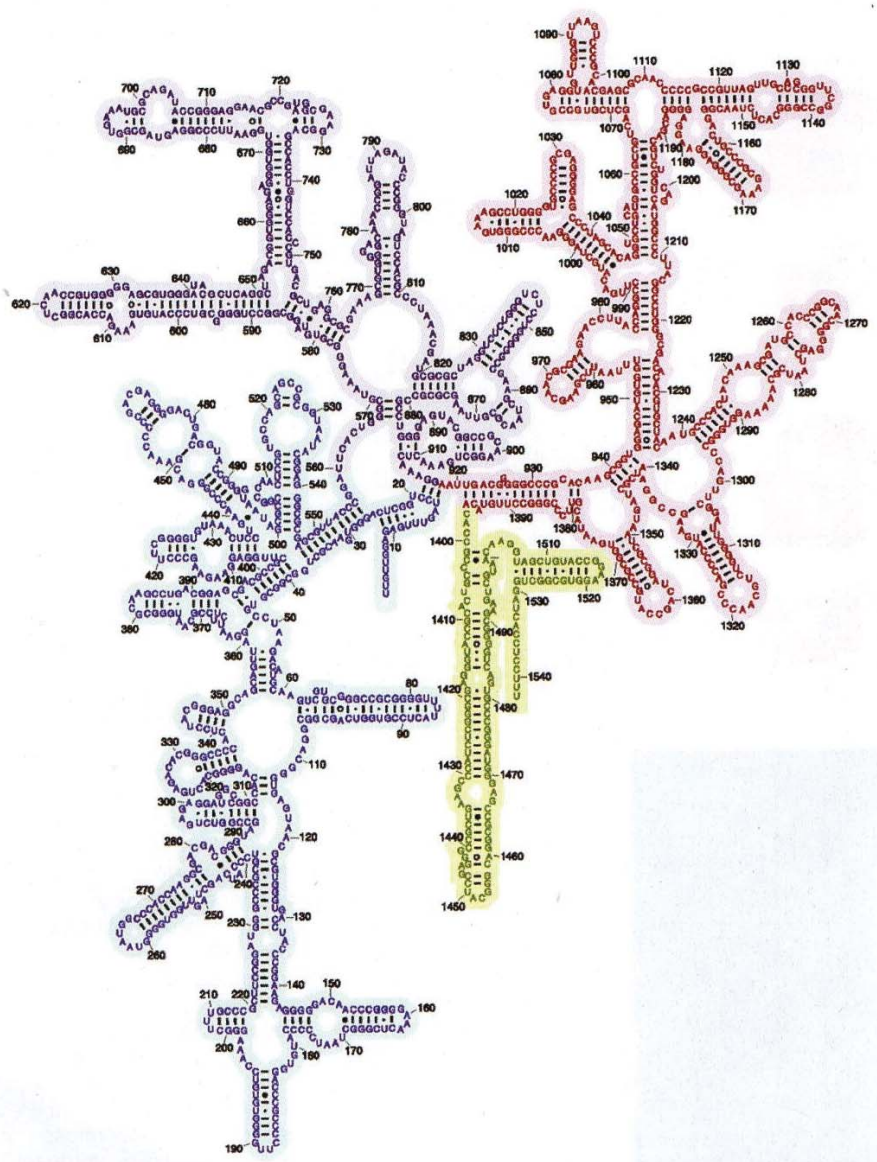


FIGURA 9.5 Estructura del ARNr 16S. El apareamiento de los pares de bases complementarios da lugar a una estructura secundaria característica. (De M. M. Yusupov y cols., 2001. *Science* 292: 883.)

◆ Aunque la secuencia de los ARN ribosómicos está conservada en gran medida, a lo largo de la evolución se han producido sustituciones. La comparación de las secuencias de ARNr constituye una potente herramienta para determinar las relaciones evolutivas entre distintas especies.

ciados a las proteínas ribosómicas se pliegan en un nivel conformacional superior formando estructuras tridimensionales. Inicialmente se pensaba que los ARNr tenían un papel exclusivamente estructural, siendo un andamio sobre el que se ensamblaban las proteínas ribosómicas. Sin embargo, con el descubrimiento de la actividad catalítica de otras moléculas de ARN (p. ej., ARNasa P y el corte y empalme de los intrones, explicado en el Cap. 8), la posible actividad catalítica del ARNr está mucho más aceptada. De acuerdo con esta hipótesis se ha visto que los ARNr son absolutamente necesarios para el ensamblaje *in vitro* de los ribosomas funcionales. Por otro lado, la falta de proteínas ribosómicas provoca un descenso, pero no una pérdida completa, de actividad ribosómica.

La evidencia de la actividad catalítica del ARNr se obtuvo con los experimentos de Harry Noller y sus colaboradores en 1992. Estos investigadores demostraron que la subunidad grande del ribosoma es capaz de catalizar la formación de enlaces peptídicos (la reacción de la peptidil transferasa) incluso tras la extracción de, aproximadamente, el 90% de las proteínas del ribosoma mediante técnicas estandarizadas de extracción de proteínas. Por otro lado, vieron que tratando el ribosoma con ARNasa no se formaba el enlace peptídico, lo que reforzaba la hipótesis de que la formación del enlace peptídico es una reacción catalizada por el ARN. Sin embargo, algunas proteínas ribosómicas no podían eliminarse bajo condiciones que dejasen al ARN ribosómico intacto, de modo que el papel de las proteínas ribosómicas como catalizadores de la formación del enlace peptídico no podía descartarse por completo.

Evidencia de que la síntesis proteica está catalizada por el ARNr se obtuvo con el primer análisis estructural de alta resolución de la subunidad 50S, que fue descrito por Peter Moore, Thomas Steitz y sus colaboradores en el año 2000 (**Fig. 9.6**). Esta visión a nivel atómico de la estructura del ribosoma

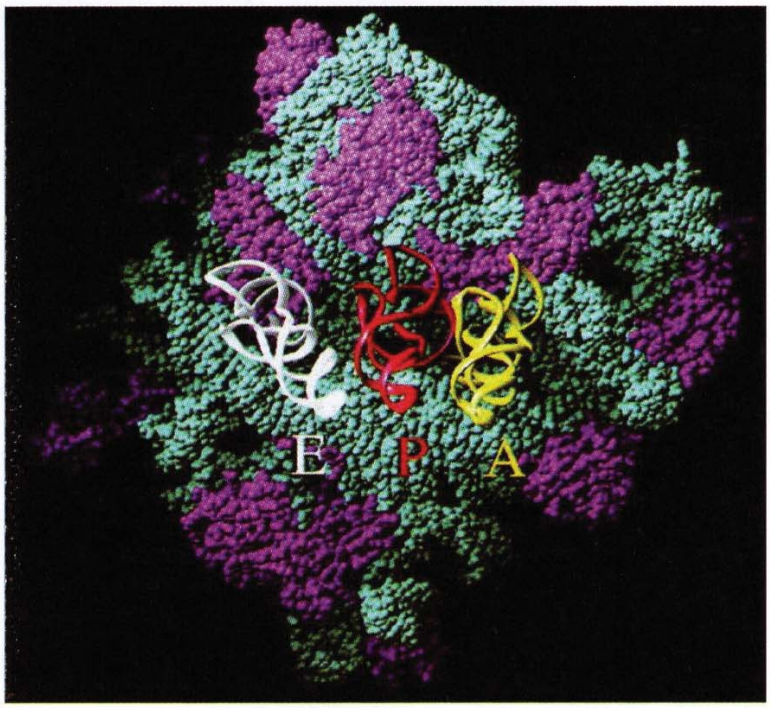


FIGURA 9.6 Estructura de la subunidad ribosómica 50S. Un modelo de alta resolución de la subunidad ribosómica 50S con tres moléculas de ARNt adheridas a los dominios A (aminoacil), P (peptidil) y E (salida) del ribosoma (véase Fig. 9.13). Las proteínas ribosómicas se muestran en violeta y el ARNr en verde agua. (De P. Nissen y cols., 2000. *Science* 289: 920.)

reveló que las proteínas ribosómicas estaban notablemente ausentes del sitio en el que se producía la reacción peptidil transferasa, poniendo de manifiesto que el ARNr era el responsable de catalizar la formación del enlace peptídico. En otros trabajos se ha dilucidado el mecanismo a través del cual el ARNr cataliza la reacción de la peptidil transferasa y se ha comprobado que la subunidad grande del ribosoma funciona como una ribozima, de modo que el ARN cataliza la reacción principal de la síntesis de proteínas. En lugar de ser los principales componentes catalíticos de los ribosomas, las proteínas ribosómicas ahora se cree que juegan un papel principalmente estructural.

El papel catalítico del ARNr en la formación del enlace peptídico tiene importantes implicaciones en la evolución. Se cree que los ARN fueron las primeras macromoléculas con capacidad de autorreplicación (véase Cap. 1); ésto se fundamenta en el hecho de que las ribozimas, como la ARNasa P y los intrones que participan en su propio proceso de corte y empalme, catalizan reacciones en las que participan sustratos tipo ARN. El papel del ARNr en la formación del enlace peptídico amplía la actividad catalítica del ARN, desde su capacidad de autorreplicación hasta una participación directa en la síntesis de proteínas. Estudios adicionales demuestran que el ARNr de *Tetrahymena* puede catalizar la unión de los aminoácidos al ARN, lo que da crédito a la posibilidad de que las aminoacil ARNt sintetasas primigenias estuvieran formadas por ARN y no por proteínas. La capacidad de las moléculas de ARN para catalizar las reacciones necesarias para la síntesis de proteínas además de su autorreplicación puede ser un paso clave para entender la evolución de las células.

Organización de los ARN mensajeros e inicio de la traducción

Aunque los mecanismos de la síntesis de proteínas en células procariotas y eucariotas son similares, hay algunas diferencias, en particular en las señales que determinan el sitio del ARNm molde a partir del que se debe iniciar la síntesis de una cadena polipeptídica (**Fig. 9.7**). La traducción no empieza

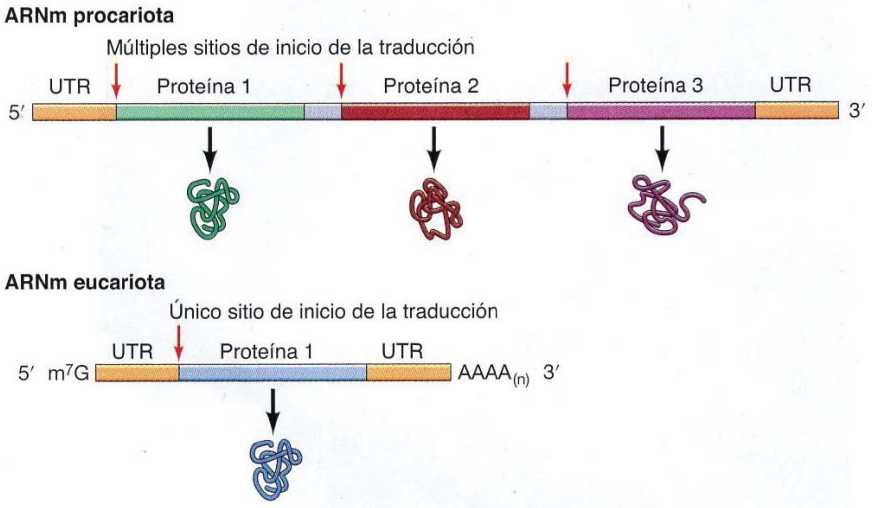


FIGURA 9.7 ARN mensajeros procariotas y eucariotas. Tanto los ARN procariotas como eucariotas contienen en su extremo 5' y 3' regiones que no se traducen (UTR). Los ARNm eucariotas también contienen una cap (caperuza) de 7-metilguanosina (m^7G) en el extremo 5', y en el extremo 3' la cola poli-A. Los ARNm procariotas normalmente son policistrónicos: éstos codifican múltiples proteínas, que se traducen desde sitios de iniciación independientes. Los ARNm eucariotas son, generalmente, monocistrónicos y codifican sólo una proteína.

simplemente en el extremo 5′ del ARNm, sino que tiene lugar en un sitio de iniciación específico. La región 5′ terminal de los ARNm de procariotas y eucariotas son secuencias no codificadoras, conocidas como regiones **5′ no codificantes (UTR)**. Los ARNm de eucariotas normalmente codifican una única cadena polipeptídica, mientras que la mayoría de los ARNm de procariotas codifican múltiples polipéptidos, sintetizados de manera independiente desde distintos sitios de iniciación. Por ejemplo, el operón *lac* de *E. coli* está formado por tres genes traducidos a partir de un único ARNm (véase Fig. 8.7). Los ARN mensajeros que codifican varios polipéptidos se llaman **policistrónicos**, mientras que son **monocistrónicos** los ARN mensajeros que codifican un único polipéptido. Finalmente, tanto los ARNm de procariotas como eucariotas terminan en **regiones 3′ no codificantes**.

Tanto en células eucariotas como procariotas, la traducción siempre comienza con el aminoácido metionina, normalmente codificado por el triplete AUG. En algunas bacterias existen codones de iniciación alternativos, como GUG, pero cuando esto ocurre al principio de una cadena polipeptídica, estos codones incorporan metionina en lugar del aminoácido que codifican normalmente (GUG generalmente codifica para valina). En la mayoría de las bacterias, la síntesis de proteínas se inicia con un residuo de metionina modificado (*N*-formilmetionina), mientras que la metionina sin modificar inicia la síntesis en eucariotas (con excepción de las mitocondrias y cloroplastos, orgánulos cuyos ribosomas tienen muchas semejanzas con los ribosomas de bacterias).

Las señales que identifican el codón de iniciación son distintas en células procariotas y eucariotas, debido a las diferencias que existen entre los ARNm policistrónicos y monocistrónicos (**Fig. 9.8**). Los codones de iniciación en los ARNm bacterianos son precedidos por una secuencia específica (llamada **secuencia Shine-Dalgarno**, en honor a sus descubridores John Shine y Lynn Dalgarno) complementaria de una secuencia del ARNr 16S cerca del extremo 3′, que aproxima el ARNm al ribosoma para que tenga lugar la traducción. Este apareamiento de bases complementarias permite a los ribo-

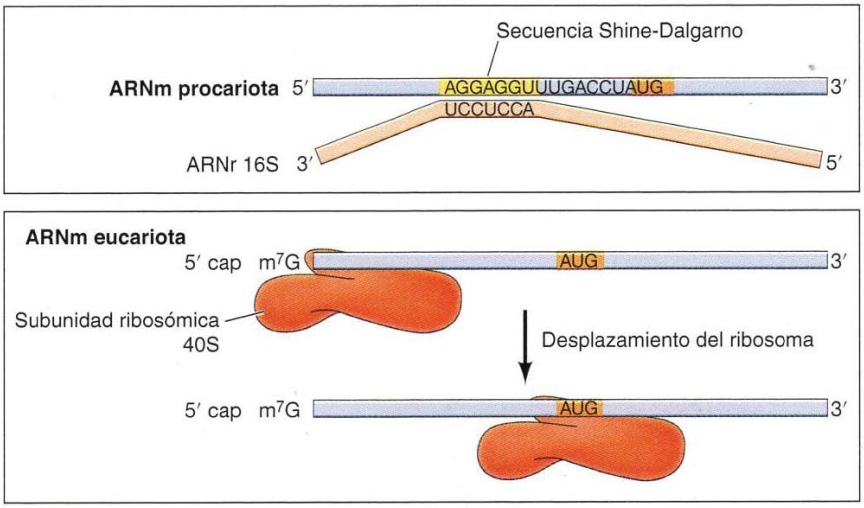


FIGURA 9.8 Señales de inicio de la traducción. El lugar de iniciación en los ARNm de procariotas es una secuencia llamada secuencia Shine-Dalgarno que precede al codón de iniciación AUG. La complementariedad de bases entre la secuencia Shine-Dalgarno y la secuencia del ARNr 16S cerca del extremo 3' alinea el ARNm con el ribosoma. En las células eucariotas el ARNm se une a la subunidad 40S del ribosoma por la caperuza de 7-metilguanosina en el extremo 5'. Entonces el ribosoma se desplaza por el ARNm hasta encontrar un codón de iniciación AUG.

somas de bacterias iniciar la traducción no sólo en el extremo 5′ del ARNm, sino también en sitios de inicio dentro de los mensajeros policistrónicos. A diferencia de procariotas, en células eucariotas los ribosomas se unen al ARNm mediante el reconocimiento de la 7-metilguanosina en el extremo 5′ cap (véase Fig. 8.44). De esta forma los ribosomas se desplazan por la secuencia del mensajero hasta encontrar un codón de iniciación AUG. Las secuencias que flanquean a los tripletes AUG influyen en la eficacia de la iniciación; así, en muchos casos el primer AUG en el ARNm no es reconocido y la traducción comienza en otro triplete AUG más alejado del extremo 5′.

Además, debe tenerse en cuenta que varios ARNm víricos y celulares poseen sitios de entrada internos para ribosomas en los que puede iniciarse la traducción mediante la unión de un ribosoma a una posición interna del ARNm. Al parecer, este mecanismo alternativo de inicio se activa en condiciones de estrés celular para permitir la traducción selectiva de algunas moléculas de ARNm cuando se encuentra bloqueado el modo normal de inicio a partir de la caperuza 5′, como se comentará en una sección posterior de este capítulo. No se conoce el mecanismo a través del cual se inicia la traducción en estos sitios internos de entrada para ribosomas, por lo que siguen siendo objeto de activa investigación.

ANIMACIÓN 9.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a9.1

Traducción. La traducción es la síntesis de polipéptidos dirigida por ARN.

Mecanismo de la traducción

La traducción generalmente se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación (**Fig. 9.9**). Tanto en eucariotas como en procariotas el primer paso de la fase de iniciación es la unión de un metionil ARNt específico y el ARNm a la subunidad menor del ribosoma. A continuación, la subunidad mayor del ribosoma se une al complejo, formando un ribosoma funcional sobre el que tiene lugar la elongación de la cadena polipeptídica. Un número de proteínas no ribosómicas específicas también son necesarias para diversas fases del proceso de traducción (**Tabla 9.1**).

VÍDEO 9.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v9.1

Traducción del ARNm. En la traducción, el ARNm es decodificado por un ribosoma para producir una secuencia específica de aminoácidos: una proteína.

En las bacterias, la traducción comienza cuando una subunidad ribosómica 30S se une a dos **factores de iniciación,** IF1 e IF3 (**Fig. 9.10**). El tercer factor de iniciación (IF2, que se une a GTP), el ARNm y el *N*-formilmetionil ARNt iniciador se unen después a este complejo, en el que IF2 interacciona de forma específica con el ARNt iniciador. A continuación, el ARNt se une al codón de iniciación del ARNm y se liberan IF3 e IF1. Una subunidad ribosómica 50S se asocia al complejo, lo que induce la hidrólisis del GTP unido a IF2 y la liberación de este último factor (unido a GDP) del complejo.

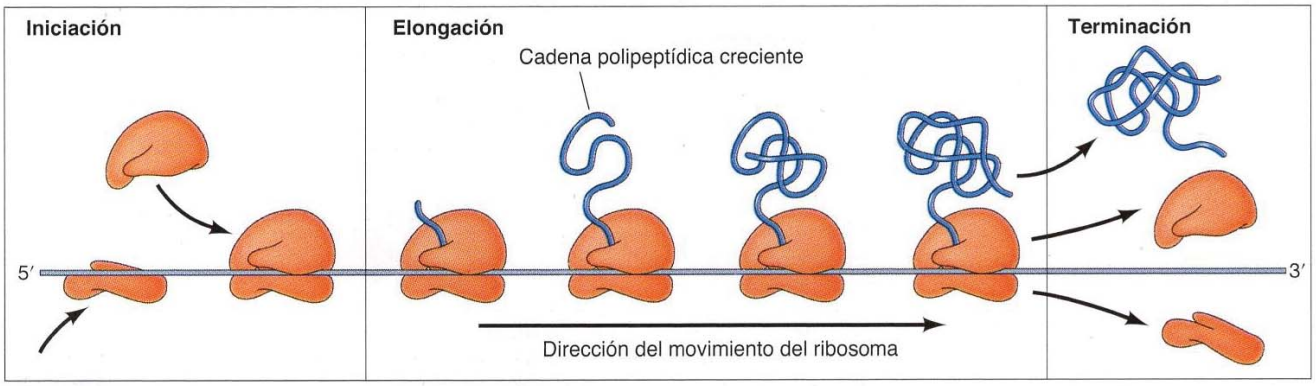


FIGURA 9.9 Esquema de la traducción.

TABLA 9.1 Factores de traducción

Función	Procariotas	Eucariotas
Iniciación	IF1, IF2, IF3	eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, eIF5, eIF5B
Elongación	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF1α, eEF1βγ, eEF2
Terminación	RF1, RF2, RF3	eRF1, eRF3

De este modo se forma un complejo de iniciación 70S (formando la asociación de ARNm y ARNt iniciador al ribosoma) preparado para catalizar la formación de un enlace peptídico durante la fase de elongación de la traducción.

La etapa de iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotas es un proceso mucho más complejo y requiere al menos 12 proteínas distintas (cada una de las cuales está formada por múltiples cadenas polipeptídicas), lla-

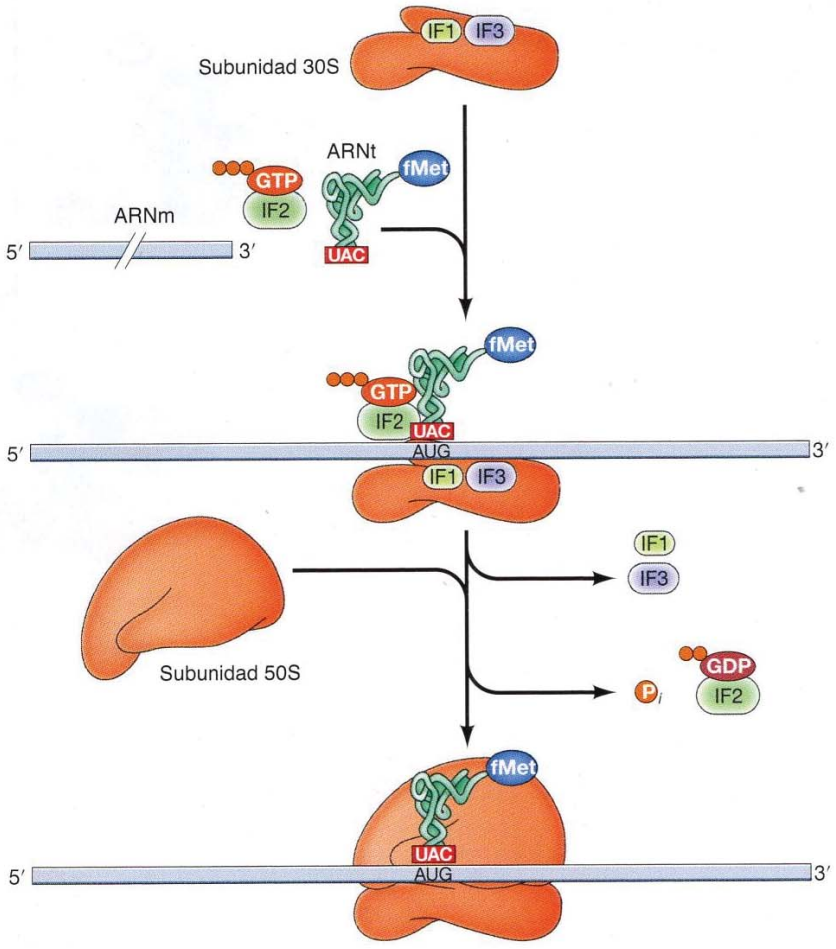
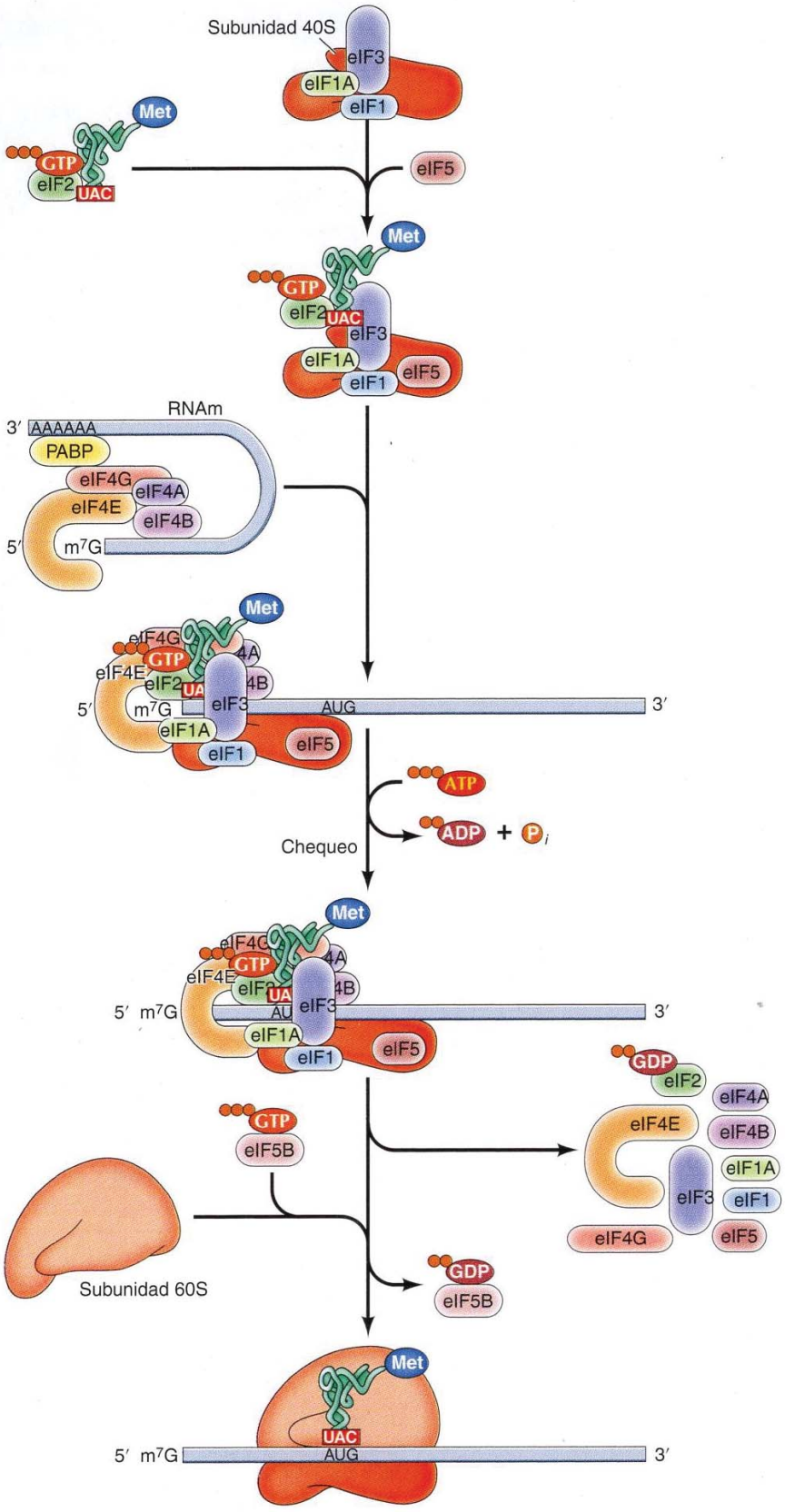


FIGURA 9.10 Inicio de la traducción en bacterias. Los factores de iniciación IF1 e IF3 se encuentran unidos inicialmente a la subunidad ribosómica 30S. A continuación, el ARNm, el *N*-formilmetionil (fMet) ARNt iniciador e IF2 (unido a GTP) se unen a este complejo. Se liberan IF1 e IF3 y la subunidad 50S se asocia al complejo, lo que induce la hidrólisis del GTP unido y la liberación de IF2 unida a GDP.

FIGURA 9.11 Iniciación de la traducción en células eucariotas. Los factores de iniciación eIF1, eIF1A y eIF3 se unen a la subunidad ribosómica 40S. El metionil ARNt iniciador es reconocido por eIF2 (que se encuentra formando un complejo con GTP), y forma un complejo con la subunidad 40S y eIF5. El ARNm es llevado hasta la subunidad 40S por eIF4E (que se une al cap en 5'), eIF4G (que se une tanto a eIF4E como al cap 5' y PABP en la cola poli-A), eIF4A, y eIF4B. A continuación el ribosoma se desplaza sobre el ARNm para identificar el primer codón de iniciación AUG. Este desplazamiento requiere energía y se acompaña de la hidrólisis de ATP. Cuando el AUG de iniciación es identificado, eIF5 desencadena la hidrólisis del GTP unido a eIF2, seguido de la liberación de eIF2 (formando un complejo con GDP) y otros factores de iniciación. A continuación, la subunidad ribosómica 60S se une al complejo 40S, gracias a la acción de eIF5B.



madas eIF (*f*actores de *i*niciación *e*ucarióticos, véase Tabla 9.1). Los factores eIF1, eIF1A y eIF3 se unen a la subunidad ribosómica 40S, y eIF2 (en un complejo con GTP) se une al metionil ARNt iniciador (**Fig. 9.11**). Un complejo de preiniciación se forma a continuación mediante la asociación de la subunidad 40S, con eIF-45 y el ARNt iniciador. El ARNm es reconocido y dirigido hacia el ribosoma por los factores eIF-4. El cap del extremo 5′del ARNm es reconocido por el eIF-4E, que forma un complejo con eIF-4A y eIF-4G. eIF-4G también se une a la proteína de unión a poli-A (PABP: *poly-A binding protein*), que está asociado con la cola de poli-A en el extremo 3′ del ARNm. Por tanto, los factores de iniciación eucariotas reconocen tanto el extremo 5′ como 3′ del ARNm, siendo responsables del efecto estimulador de la poliadenilación en la traducción. Los factores de iniciación eIF-4E y eIF-4G en asociación con eIF-4A y eIF-4B dirigen el ARNm hacia la subunidad ribosómica 40S, mediante interacción entre los factores eIF-4G y eIF-3. La subunidad ribosómica 40S unida al metionil ARNt y a los eIF chequea el ARNm hasta identificar un codón de iniciación AUG. Cuando el codón AUG es reconocido, eIF-5 provoca la hidrólisis del GTP unido a eIF-2. Los factores de iniciación (incluyendo eIF-2 unido a GDP) son liberados, y eIF5B (unido inicialmente a GTP) facilita la unión de una subunidad 60S (asociado con la hidrólisis del GTP) para formar el complejo de iniciación 80S de las células eucariotas.

Como describimos en una sección anterior del capítulo, algunos ARNm víricos y de células eucariotas tienen sitios de entrada al ribosoma internos (IRES) en los que puede iniciarse la traducción independientemente del casquete 5′. En los ARNm víricos, esto puede ser mediado por la unión de secuencias IRES directamente al eIF4G asociado al eIF4A, o bien a las subunidades ribosómicas 40S (**Fig. 9.12**). Todavía no conocemos el mecanismo de

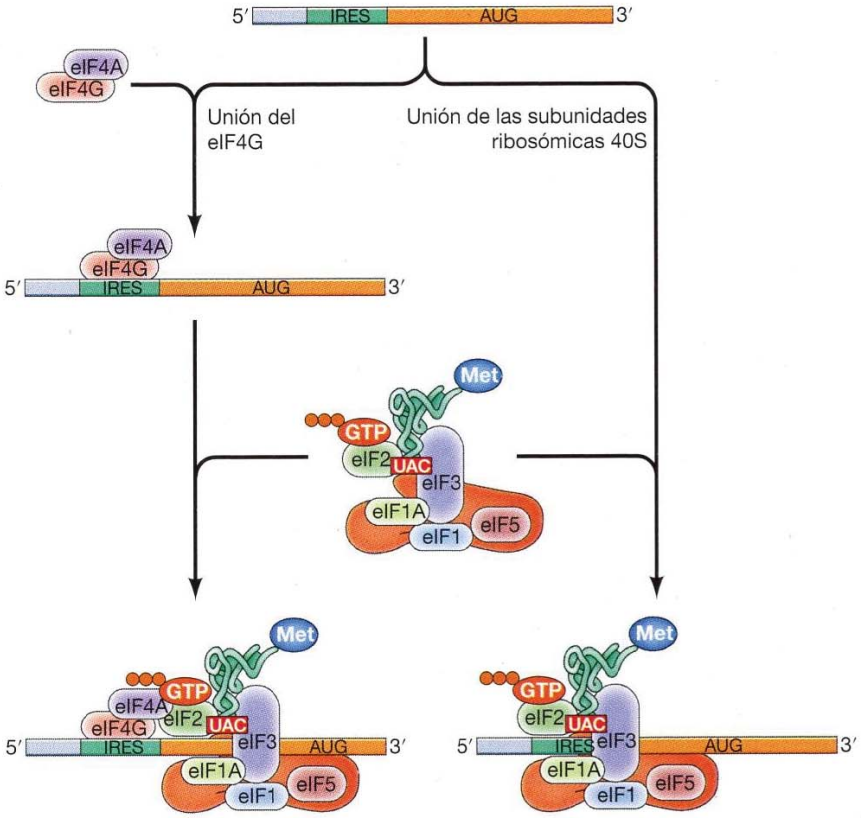


FIGURA 9.12 Inicio de la traducción en sitios de entrada del ribosoma interno. Los sitios de entrada del ribosoma interno (IRES) pueden reconocerse en algunos ARNm debido a eIF4G asociado a eIF4A, seguido del reclutamiento de la subunidad ribosómica 40S asociada al metionil ARNt iniciador unido por eIF2. Alternativamente, los IRES en otros ARNm se reconocen directamente por la subunidad ribosómica 40S.

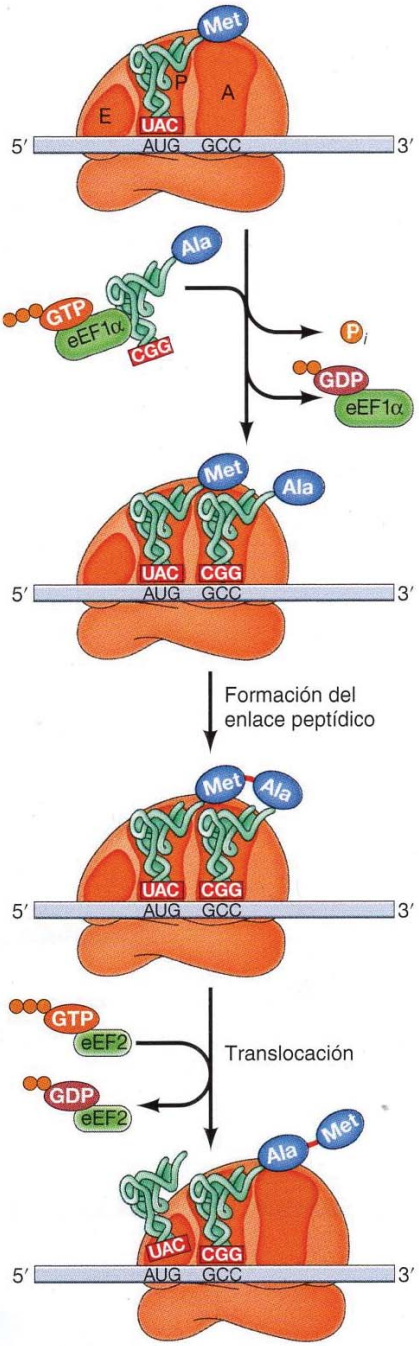


FIGURA 9.13 Etapa de elongación de la traducción. El ribosoma tiene tres sitios de unión al ARNt, llamados P (peptidil), A (aminoacil) y E (liberación). El *N*-formilmetionil ARNt iniciador se sitúa en el sitio P, dejando un sitio A libre. El segundo aminoacil ARNt (p. ej., alanil ARNt) es dirigido hacia el sitio A por eEF1α (unido a GTP). Tras la hidrólisis de GTP, eEF1α (unido a GDP) sale del ribosoma, dejando al alanil ARNt situado en el sitio A. Se forma el enlace peptídico y se transfiere la metionina al aminoacil ARNt en el sitio A. Entonces el ribosoma se desplaza tres nucleótidos a lo largo del ARNm. Este movimiento transloca el peptidil (Met-Ala) ARNt al sitio P y al ARNt libre al sitio E, dejando un sitio A vacío para la unión de un nuevo aminoácido. La translocación está mediada por eEF2, acoplada a la hidrólisis de GTP. El proceso en procariotas se ilustra en el esquema, siendo muy similar al de eucariotas. (En la Tabla 9.1 se nombran los factores de elongación de eucariotas.)

acción de los IRES en los ARNm celulares, pero se cree que implica la unión de un complejo eIF4G-eIF4A.

Tras la formación del complejo de iniciación, la traducción continúa con la elongación de la cadena polipeptídica. El mecanismo de la elongación en células procariotas y eucariotas es muy similar (**Fig. 9.13**). El ribosoma tiene tres sitios para la unión del ARNt, denominados lugar P (peptidil), A (aminoacil) y E (liberación). El metionil ARNt iniciador se une al sitio P. La primera etapa de la elongación es la unión del siguiente aminoacil ARNt al sitio A mediante emparejamiento con el segundo codón del mensajero. El aminoacil ARNt es guiado hacia el ribosoma por un **factor de elongación** (EF-Tu en procariotas y eEF1α en eucariotas), unido a GTP. La selección del aminoacil ARNt para su incorporación en la cadena polipeptídica creciente es un paso crítico que determina la precisión de la síntesis proteica. A pesar de que esta selección se basa en la complementariedad de bases entre el codón del ARNm y el anticodón en el ARNt, el apareamiento de las bases no es suficiente para responsabilizarse de la precisión de la síntesis de proteínas, que posee una tasa de error inferior a 10^{-3}. Esta precisión la proporciona un «centro descodificador» en la subunidad pequeña del ribosoma, que reconoce los pares de bases codón-anticodón correctos y discrimina los errores. La inserción de un aminoacil ARNt correcto en el dominio A da lugar a un cambio conformacional que induce la hidrólisis del GTP unido a eEF1α y la liberación del factor de elongación unido a GDP. Un resultado notable de los estudios estructurales recientes del ribosoma es que el reconocimiento del apareamiento codón-anticodón correcto en el centro descodificador, como la actividad peptidil transferasa, se basa principalmente en la actividad del ARN ribosómico en lugar de las proteínas.

Una vez que eEF1α ha salido del ribosoma, se forma un enlace peptídico entre el metionil ARNt iniciador en el sitio P y el segundo aminoacil ARNt en el sitio A. Esta reacción está catalizada por la subunidad ribosómica grande, realizando esta actividad el ARNr (como ya se ha explicado). El resultado es la transferencia de la metionina al aminoacil ARNt en el sitio A del ribosoma, formándose un peptidil ARNt en esta posición y dejando un ARNt libre en el sitio P. La etapa que sigue a la elongación es la translocación, que requiere otro factor de elongación (EF-G en procariotas y eEF-2 en eucariotas), y también está acoplada a la hidrólisis de GTP. Durante la translocación, el ribosoma se desplaza tres nucleótidos sobre el ARNm, colocándose un nuevo codón en un sito A libre. En esta etapa se transloca el peptidil ARNt desde el sitio A al sitio P, y el ARNt libre desde el sitio P al sitio E. De esta manera el ribosoma tiene un peptidil ARNt en el sitio P y un sitio A vacío. La unión de un nuevo aminoacil ARNt al sitio A induce la liberación

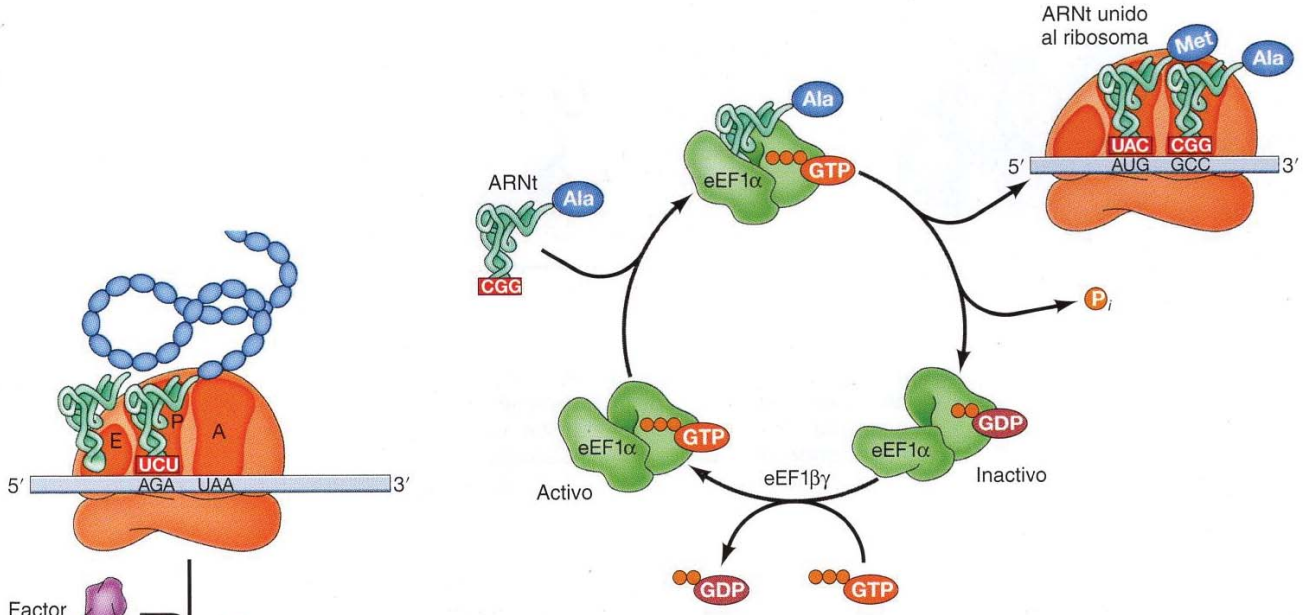
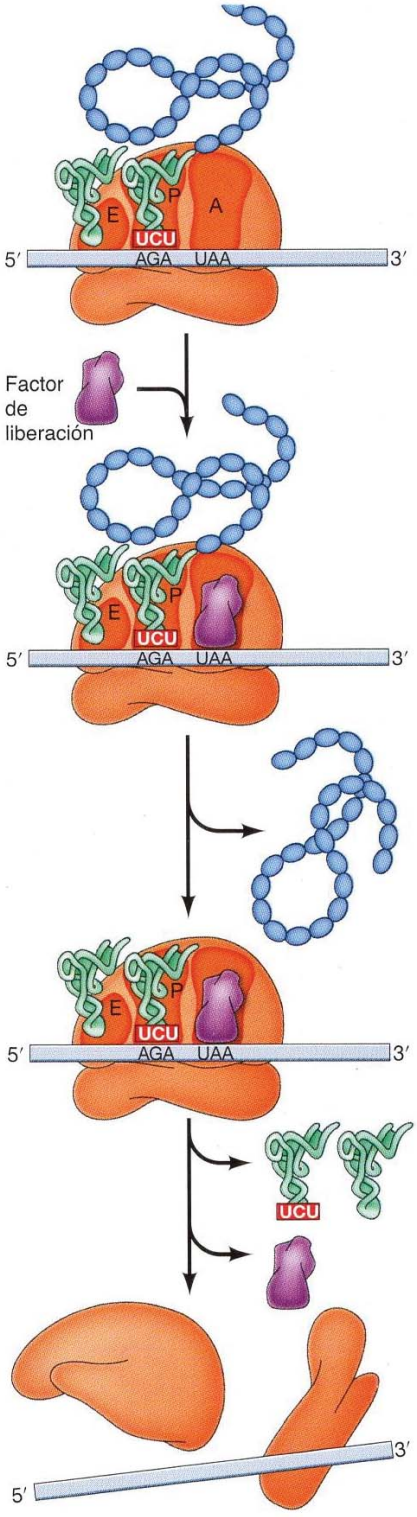


FIGURA 9.14 Regeneración de eEF1α/GTP. El complejo eEF1α/GTP dirige el aminoacil ARNt al ribosoma. El GTP unido es hidrolizado cuando el ARNt correcto es insertado, liberándose el complejo eEF1α/GDP, el cual es inactivo e incapaz de unir otro ARNt. Para que la translocación continúe, se debe regenerar otro eEF1α/GTP, participando en este proceso otro factor, eEF1βγ, que facilita la sustitución de GDP por un GTP libre.



del ARNt libre del sitio E, dejando al ribosoma preparado para la inserción de otro aminoácido a la cadena polipeptídica en crecimiento.

El proceso de elongación debe continuar, y para ello eEF1α (o EF-Tu) que es liberado del ribosoma unido a GDP, se debe convertir de nuevo en la forma unida a GTP (**Fig. 9.14**). Esta conversión requiere la presencia de un tercer factor de elongación, eEF1βγ (EF-Ts en procariotas), que se une a eEF-1α/ GDP promoviendo la sustitución de GDP por GTP. Con este cambio se regenera un nuevo eEF1α/GTP preparado para dirigir un nuevo aminoacil ARNt al sitio A del ribosoma, comenzando un nuevo ciclo de elongación. La regulación del factor eEF1α por la unión a GTP y la hidrólisis de éste es un ejemplo de regulación de actividad de proteínas. Como se explicará en capítulos posteriores, mecanismos similares de control de la actividad ocurren en una gran variedad de proteínas que participan en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares, así como en el transporte y secreción de proteínas.

La elongación de la cadena polipeptídica continúa hasta que un codón de terminación (UAA, UAG o UGA) se coloca en el sitio A del ribosoma. Las células no contienen ARNt con anticodones complementarios de los tripletes de terminación, pero sí tienen **factores de liberación** que los reconocen y terminan la síntesis de proteínas (**Fig. 9.15**). Las células procariotas cuentan con dos factores de liberación que reconocen los codones de terminación (véase Tabla 9.1): RF1 reconoce UAA o UAG y RF-2 reconoce UAA o

FIGURA 9.15 Terminación de la traducción. Un codón de terminación (p. ej., UAA) en el sitio A es reconocido por un factor de liberación en vez de por un ARNt. El resultado es la liberación de la cadena polipeptídica completa, seguido de la disociación del ARNt y ARNm del ribosoma.

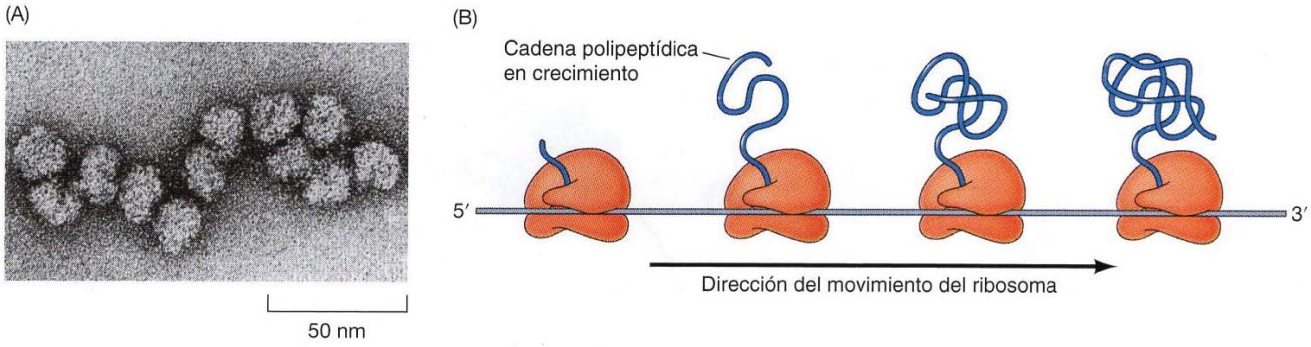


FIGURA 9.16 Polisomas. Los ARN mensajeros son traducidos por múltiples ribosomas formando un polisoma. (A) Micrografía electrónica de un polisoma eucariota. (B) Esquema general de un polisoma. Obsérvese que los ribosomas próximos al extremo 3' del ARNm contienen cadenas polipeptídicas más largas. (A, de M. Boublik y cols., 1990. *The Ribosome*, pág. 117. Cortesía de American Society for Microbiology.)

UGA. En células eucariotas un único factor de liberación (eRF1) reconoce los tres codones de terminación. Además las células procariotas y eucariotas también tienen factores de liberación (RF3 y eRF3 respectivamente) que no reconocen codones de terminación específicos pero actúan con RF1 (o eRF1) y RF2. El factor de liberación se une a un codón de terminación en el sitio A estimulando la hidrólisis del enlace entre el ARNt y la cadena polipeptídica en el sitio P, permitiendo la salida de ésta del ribosoma. El ARNt es liberado posteriormente, disociándose las subunidades ribosómicas y la hebra de ARNm.

Una única molécula de ARNm puede ser traducida por células procariotas y eucariotas simultáneamente por muchos ribosomas. Una vez que el ribosoma se aleja de un sitio de iniciación, otro puede unirse al ARNm e iniciar la síntesis de una nueva cadena polipeptídica. Así, los ARNm son normalmente traducidos por una serie de ribosomas, separados entre ellos por aproximadamente 100-200 nucleótidos (**Fig. 9.16**). El conjunto de ribosomas unido a una molécula de ARNm se llama polirribosoma o **polisoma**. Cada ribosoma del polisoma funciona de manera independiente para sintetizar una cadena polipeptídica distinta.

Regulación de la traducción

Aunque la transcripción es el nivel principal de control de la expresión génica, la regulación de la traducción de moléculas de ARNm también desempeña una función destacada en la modulación de la expresión génica. La traducción de ciertas de estas moléculas puede controlarse a través de proteínas represoras de la traducción y microARN no codificantes, que constituyen unos reguladores clave de la expresión génica en los eucariotas. Adicionalmente, la actividad traduccional global de las células está modulada en respuesta al estrés celular, la disponibilidad de nutrientes y la estimulación por factores de crecimiento.

Un mecanismo de regulación traduccional es la unión de proteínas represoras, que bloquean la traducción, a secuencias específicas del ARNm. El ejemplo mejor conocido de este mecanismo en células eucariotas es la regulación de la síntesis de ferritina, una proteína que almacena hierro dentro de la célula (**Fig. 9.17**). La traducción del ARNm que codifica para ferritina está regulada por las reservas de hierro: se sintetiza más ferritina cuanto más hierro (IRP) haya. Esta regulación está mediada por proteínas reguladoras del hierro que (en ausencia de hierro) se une a una secuencia (secuen-

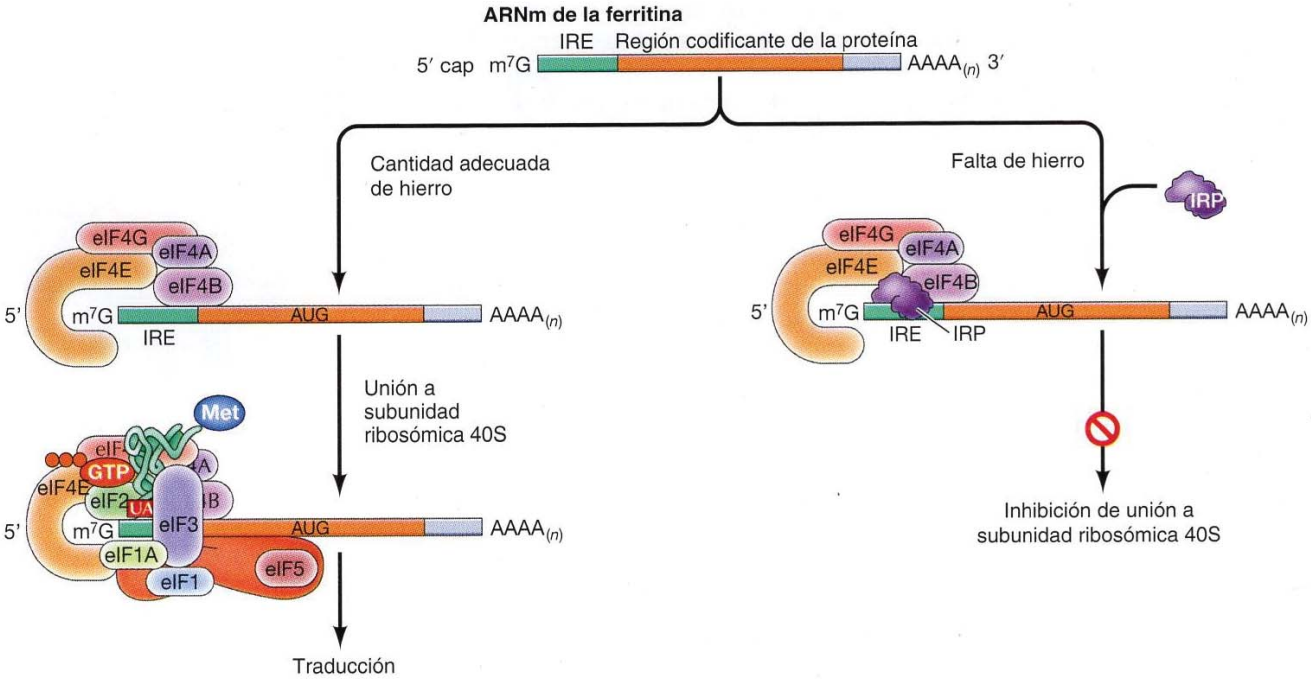


FIGURA 9.17 Regulación de la traducción de la ferritina. El ARNm contiene una secuencia de respuesta al hierro (IRE) cerca del cap del extremo 5'. En presencia de una cantidad adecuada de hierro, la traducción del ARNm ocurre normalmente. Sin embargo, si la cantidad de hierro disminuye, una proteína (denominada proteína de unión a la secuencia de respuesta al hierro o IRP) se une a la secuencia IRE bloqueando la traducción al interferir en la unión del ARNm a la subunidad ribosómica 40S.

◆ Los ARNm específicos se localizan en las sinapsis entre neuronas. La traducción regulada de estos ARNm localizados, parece ser necesaria para la formación y el mantenimiento de sinapsis y puede jugar un papel en el aprendizaje y memoria.

cia de respuesta al hierro o IRE) en el extremo 5′ no codificante del ARNm de la ferritina, bloqueando la traducción. En presencia de hierro, la proteína reguladora del hierro no se une ya a las secuencias IRE, de modo que puede comenzar la traducción del ARNm de la ferritina. La secuencia IRE se localiza a unos 40 nucleótidos de distancia de la caperuza del extremo 5′ y se cree que las proteínas reguladoras del hierro inhibirían la traducción al interferir en la unión del ARNm a la subunidad ribosómica 40S.

La traducción también puede ser regulada por proteínas que se unen a secuencias específicas de las regiones 3′ no traducidas de algunas ARNm. En la mayoría de los casos, estos represores traduccionales funcionan uniéndose al factor de iniciación eIF4E que interfiere en la interacción de eIF4E y eIF4G e inhibe el comienzo de la traducción (**Fig. 9.18**). Las proteínas que se unen a las regiones 3′ no traducidas del ARNm también son responsables de la localización del ARNm en regiones específicas de las células, permitiendo que se produzcan proteínas en localizaciones subcelulares específicas. La localización de ARNm es una parte importante de la regulación de la traducción en una variedad de tipos celulares, incluyendo óvulos,

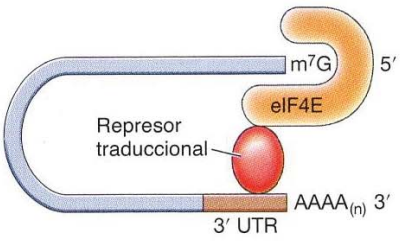


FIGURA 9.18 Represor traduccional unido a las secuencias 3' no traducidas. Los represores traduccionales pueden unirse a las secuencias reguladoras de la región 3' no traducida (UTR) e inhibir la traducción mediante su unión al factor de iniciación eIF4E, unido a la caperuza 5'. Esto interfiere con la traducción mediante el bloqueo de la unión de eIF4E a eIF4G en un complejo de iniciación normal (véase Fig. 9.11).

embriones, células nerviosas y fibroblastos en movimiento. Por ejemplo, la localización de ARNm en regiones específicas de los óvulos o embriones juega un papel importante en el desarrollo permitiendo que las proteínas codificadas se sinteticen en los sitios apropiados del embrión en desarrollo (**Fig. 9.19**). La localización de ARNm está acoplada a la regulación de su traducción, de modo que las proteínas que codifican son sintetizadas una vez que el ARNm se encuentra adecuadamente localizado en estadio apropiado del desarrollo.

La regulación traduccional es especialmente importante durante el desarrollo temprano. Como se ha estudiado en el Capítulo 8, una variedad de ARNm está almacenado (huevos no fecundados) en los óvulos en forma no traducida; la traducción de estos ARNm almacenados es activada durante la fertilización o durante estadios posteriores del desarrollo. Un mecanismo de regulación de la traducción de este tipo está controlado por la poliadenilación de los ARNm del óvulo. Muchos ARNm son almacenados sin traducir en los óvulos con pequeñas colas de poliA (aproximadamente 30 a 50 nucleótidos). En un principio, estos ARNm almacenados poseen colas largas de poli-A de unos 200 nucleótidos, al igual que otros ARNm (véase Fig. 8.45). No obstante, posteriormente son reconocidos por una proteína represora de la traducción que se une a secuencias específicas de sus regiones no traducidas del extremo 3′ y escinden la mayor parte de las colas de poli-A. Más adelante, estos ARNm almacenados se incorporarán a la traducción en una etapa adecuada del desarrollo a través del alargamiento de sus colas de poli-A hasta alcanzar varios cientos de nucleótidos. De este modo se permite la unión de la proteína de unión a poli-A (PABP), la cual estimula la traducción al interaccionar con eIF4G (véase Fig. 9.11).

Como se vio en capítulos anteriores, uno de los adelantos más fascinantes de los que hemos sido testigo a lo largo de los últimos años ha sido el descubrimiento del papel de los ARN no codificantes en la regulación de la expresión génica. Desde su identificación en el año 1998, la **interferencia de ARN (iARN)** mediada por moléculas bicatenarias cortas de ARN se ha utilizado de manera frecuente como herramienta experimental de inhibición de la expresión génica a nivel de la traducción (véase Fig. 4.38). Además, es utilizada normalmente por las células como un mecanismo importante de regulación traduccional. Los dos tipos principales de moléculas pequeñas de ARN que intervienen en la interferencia de ARN son los ARN de **interferencia pequeños (ARNsi)** y los **microARN (ARNmi);** ambos tipos tienen una longitud cercana a las 22 pares de bases, aunque difieren en sus orígenes. Los ARNsi se sintetizan como consecuencia de la escisión de ARN bicatenarios de mayor longitud por acción de la nucleasa Dicer. Los precursores bicatenarios largos de los ARNsi pueden introducirse en las células mediante métodos experimentales o bien formarse en la propia célula a partir de transcritos solapantes. Por el contrario, la ARN polimerasa II transcribe las moléculas precursoras de los ARNmi como transcritos primarios de unos 70 nucleótidos, que a continuación se someten a reacciones de escisión secuencial catalizadas por las nucleasas Drosha y Dicer para formar moléculas bicatenarias de ARN de unos 22 nucleótidos de longitud (véase Fig. 6.8). Se incorporan una hebra de las moléculas de ARNmi y ARNsi al llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), como consecuencia de lo cual los ARNmi o ARNsi dirigen al complejo hacia ARNm complementarios. En algunos casos, las moléculas de ARNsi o ARNmi inducen la escisión del ARNm diana por acción de un componente del RISC (véase Fig. 4.38), como se ha descrito en el Capítulo 4 (**Fig. 9.20**). Este suele ser el caso de los ARNsi o ARNmi que son secuencia complementaria perfecta de sus dianas de ARNm. No obstante, la mayoría de los ARNmi crean híbridos que no son perfectamente complementarios con sus dianas, de

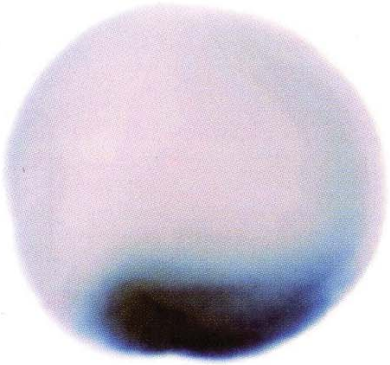


FIGURA 9.19 Localización del ARNm en ovocitos de *Xenopus*. Hibridación *in situ* que ilustra la localización del ARNm *Xlerk* a una región específica (la corteza vegetal) de los ovocitos de *Xenopus*. (Cortesía de James Deshler, Boston University.)

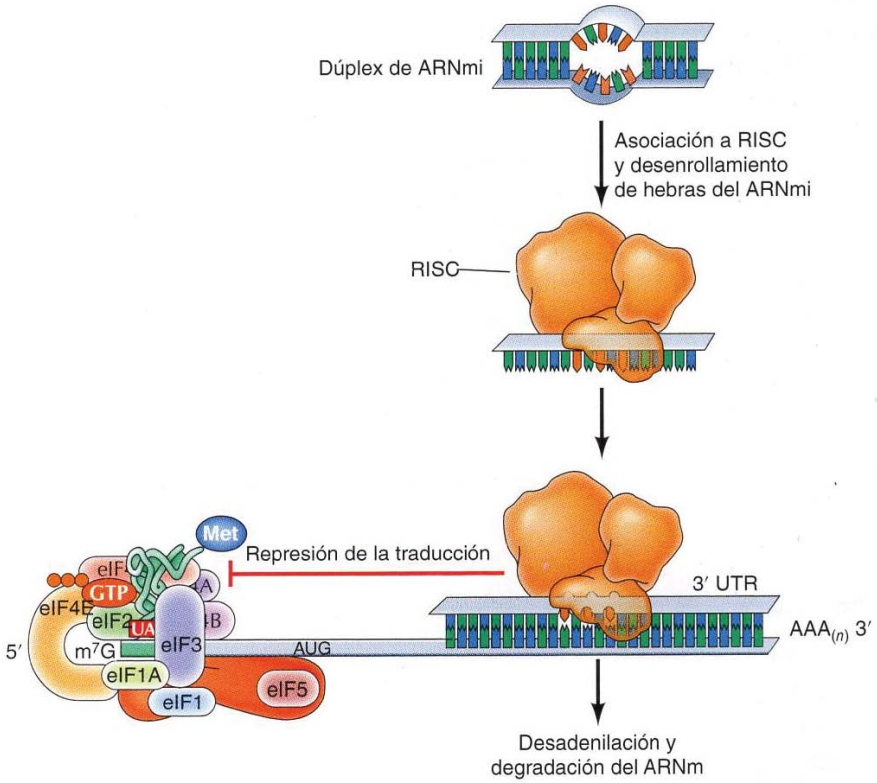


FIGURA 9.20 Regulación de la traducción por ARNmi. Los ARNmi se asocian al complejo RISC. Las dos hebras de ARNmi se desenrollan y el RISC se dirige a la región no traducida del extremo 3' (UTR) de un ARNm, lo que conduce a la inhibición de la traducción, la desadenilación y la degradación del ARNm. La inhibición de la traducción puede derivarse de la interferencia con la actividad de eIF4A y la inhibición del barrido de ribosomas.

modo que la inhibición de la traducción medida por el complejo creado por ARNmi/RISC no se acompaña de la escisión del ARNm, si bien las moléculas no apareadas de ARNmi pueden inducir la degradación de los ARNm a través de su desadenilación. El mecanismo de represión de traducción por ARNmi no se entiende aún del todo, pero parece que incluye la iniciación de la inhibición de la traducción. Datos recientes indican, además, que los ARNmi pueden interferir con la actividad de eIF4A, que actúa para desenrollar las estructuras secundarias en el ARNm y permite el barrido por ribosomas del codón de inicio. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para explicar completamente el mecanismo de la inhibición de la traducción mediante ARNmi y para determinar cómo se acopla con la estimulación de la degradación del ARNm.

Los ARNmi desempeñan un importantísimo papel en la regulación génica. Se cree que los genomas de mamífero codifican hasta 1.000 ARNmi. Asimismo, se calcula que cada ARNmi puede reconocer hasta 100 ARNm diferentes, por lo que se supone que la mitad de sus genes que codifican proteínas estaría sometido a regulación a través de algún ARNmi. Aunque sus funciones biológicas aún deben determinarse, se ha descubierto que los ARNmi intervienen en diversos procesos del desarrollo y desempeñan cometidos importantes en la regulación de la proliferación y la supervivencia de las células. Por otra parte, se ha observado que la expresión anómala de los ARNmi contribuye al cáncer y a otras enfermedades. Así pues, el estudio del mecanismo de la acción de los ARNmi y de la magnitud completa de sus funciones biológicas son ámbitos de investigación muy activos.

Otro mecanismo de regulación traduccional en células eucariotas que tiene un efecto global en la traducción más que efectos en la traducción de un mensajero específico ARNm, ocurre por la modulación de la actividad de

los factores de iniciación, en particular eIF-2 y eIF-4E. Como se explicó anteriormente, eIF-2 (formando complejo con GTP) se une al metionil ARNt iniciador, dirigiéndolo hacia el ribosoma. La liberación de eIF-2 en una etapa posterior va acompañada de la hidrólisis del GTP, liberándose un complejo inactivo eIF-2/GDP. Para participar en otro ciclo de iniciación debe regenerarse eIF-2/GTP, sustituyéndose la molécula de GDP por GTP (**Fig. 9.21**). Este intercambio está mediado por otro factor, eIF-2B. El control de la actividad de eIF-2 por la unión a GTP y la hidrólisis es similar a la que sufre el factor eEF1α (véase Fig. 9.14). Sin embargo, la regulación de eIF-2 proporciona un punto de regulación crítico en una gran variedad de células eucariotas. En concreto, tanto eIF-2 como eIF-2B pueden ser fosforiladas por

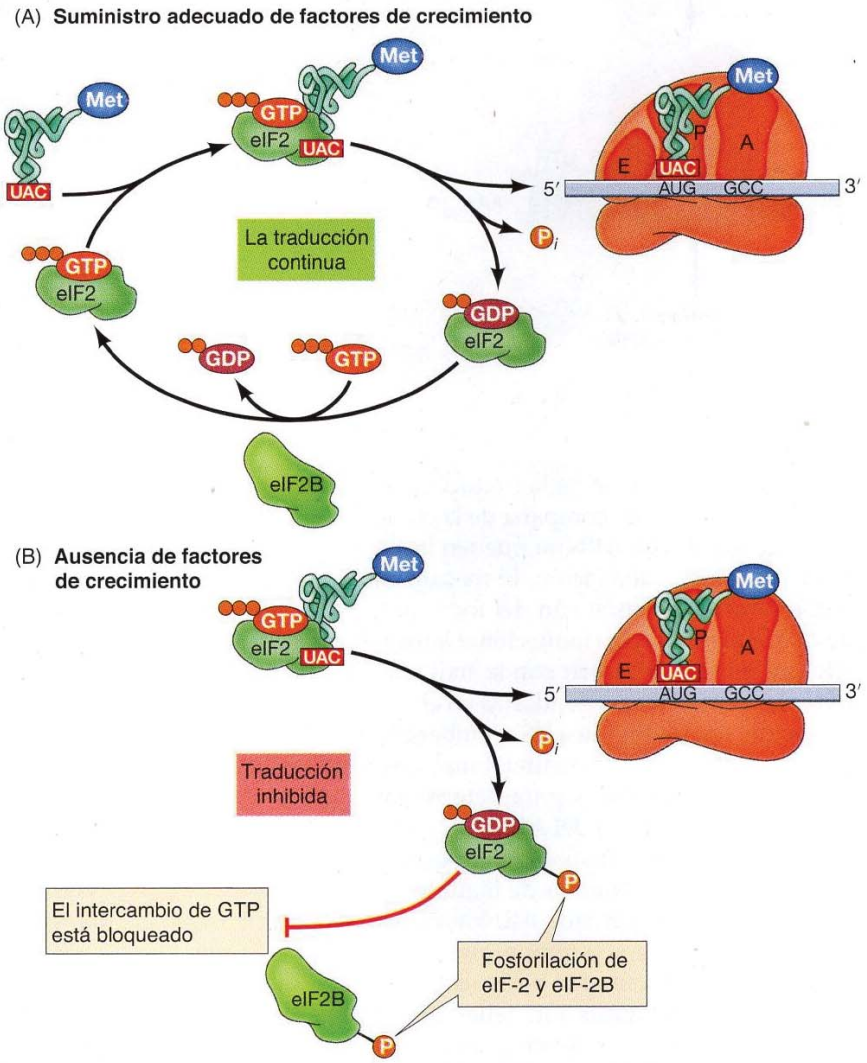


FIGURA 9.21 Regulación de la traducción mediante fosforilación de eIF-2 y eIF-2B. (A) La forma activa de eIF-2 (formando un complejo con GTP) dirige el metionil ARNt iniciador al ribosoma (véase Fig. 9.11). A continuación el eIF-2 es liberado del ribosoma en su forma inactiva unida a GDP. Para continuar la traducción, eIF-2 debe ser reactivada por eIF-2B, que estimula el intercambio de GDP por GTP. (B) La traducción puede ser inhibida (p. ej., si las células carecen de factores de crecimiento) por la acción de proteínas quinasas reguladoras que fosforilan a eIF-2 o a eIF-2B. Estas fosforilaciones bloquean el intercambio de GTP por GDP, de modo que eIF-2/GTP no puede ser regenerado.

proteínas quinasas reguladoras. Estas fosforilaciones inhiben el intercambio del GDP unido por GTP, inhibiendo así la iniciación de la traducción. Por ejemplo, en las células de mamíferos carecientes de factores de crecimiento, se activa una proteína quinasa que fosforila a eIF-2B, inhibiendo la sucesiva síntesis de proteínas.

La regulación de la actividad de eIF-4E, que se une a la caperuza 5′ del ARNm, es otro punto crítico sobre el que actúan los factores de crecimiento para controlar la síntesis proteica (**Fig. 9.22**). Por ejemplo, factores de crecimiento que estimulan la síntesis proteica en células de mamífero activan proteínas quinasas que fosforilan a proteínas reguladoras (denominadas proteínas de unión a eIF-4E, o 4E-BP del inglés *binding proteins*) que a su vez se unen a eIF-4E. En ausencia de los factores de crecimiento apropiados, las 4E-BP no fosforiladas se unen a eIF-4E e inhiben la traducción interfiriendo en la interacción de eIF-4E con eIF-4G. Cuando los factores de crecimiento están presentes en una cantidad adecuada, la fosforilación de las 4E-BP impide su interacción con eIF-4E, dando lugar a elevaciones de las tasas de iniciación de la traducción.

Cabe destacar que la inhibición global de la traducción puede favorecer la traducción selectiva de algunas moléculas de ARNm. Por ejemplo, los ARNm que albergan sitios internos de entrada de ribosomas pueden someterse a una traducción selectiva en condiciones bajo las cuales se inhibe eIF-4E y, por tanto, la iniciación dependiente de la caperuza (véase Fig. 9.12). Esta traducción selectiva de un subgrupo de ARNm puede favorecer la supervivencia celular en condiciones de estrés, como la inanición, el agotamiento de factores de crecimiento o los daños al ADN.

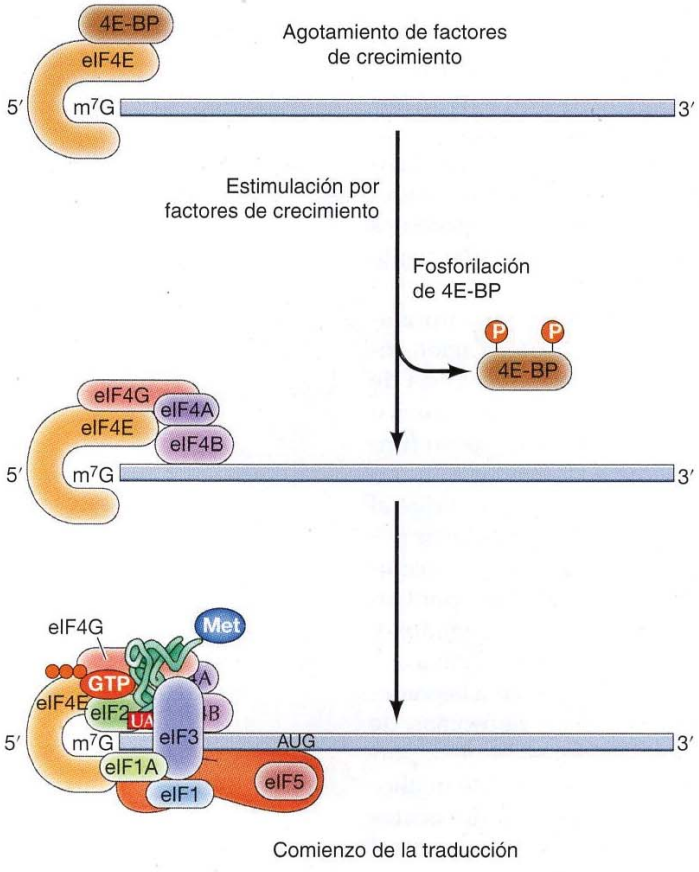


FIGURA 9.22 Regulación de eIF4E. En ausencia de factores de crecimiento, las proteínas de unión a eIF4E (4E-BP), que se unen a eIF4F e impiden su interacción con eIF4G, inhiben la traducción. Sin embargo, la estimulación por factores de crecimiento induce la fosforilación de las 4E-BP, que se disocian de eIF4E y permiten el comienzo de la traducción.

Plegamiento y procesamiento de proteínas

La traducción completa el flujo de la información genética en la célula. En este proceso la secuencia de nucleótidos del ADN se convierte en la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica. La síntesis de un polipéptido, sin embargo, no significa que la proteína sea funcional. Para ser activos, los polipéptidos deben plegarse en conformaciones tridimensionales características y, en muchos casos, varias cadenas polipeptídicas se agregan para dar lugar a un complejo funcional. Además, muchas proteínas experimentan modificaciones adicionales, incluyendo escisión y la unión covalente de carbohidratos y lípidos, que son necesarios para la correcta función y localización de las proteínas en la célula.

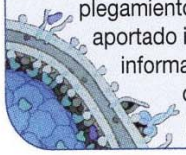
Chaperonas y plegamiento de proteínas

La conformación tridimensional de las proteínas depende de la interacción entre las cadenas laterales de sus aminoácidos, como se vio en el Capítulo 2. El principio clásico del plegamiento de una proteína es que la información necesaria para que ésta adopte la conformación tridimensional correcta la proporciona su secuencia de aminoácidos. Este principio fue establecido por los experimentos de Christian Anfinsen demostrando que la enzima ARNasa desnaturalizada puede *in vitro* volver a plegarse en una conformación activa espontáneamente (véase Fig. 2.17). En un principio se pensó que el plegamiento de proteínas ocurría por un proceso de autoensamblaje que no requería la presencia de ningún factor celular adicional. Sin embargo, estudios más recientes muestran que esto no es una buena descripción del plegamiento de proteínas en las células y se puede afirmar que en el proceso participan otras muchas proteínas.

VÍDEO 9.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v9.2

Simulación del plegamiento de proteínas. Las simulaciones por ordenador de las particularidades del plegamiento de las proteínas han aportado importantes informaciones para comprender el proceso.



Las proteínas que facilitan el plegamiento de otras proteínas se llaman **chaperonas**. El término «chaperona» fue utilizado en un principio por Ron Laskey y sus colaboradores para describir una proteína (nucleoplasmina) necesaria para el ensamblaje de los nucleosomas a partir del ADN y de las histonas. La nucleoplasmina se une a las histonas y provoca su ensamblaje en nucleosomas, pero la nucleoplasmina no forma parte de la estructura última del nucleosoma. Las chaperonas, de este modo, actúan como catalizadores que facilitan el ensamblaje sin formar parte del complejo ensamblado. Estudios más recientes han ampliado el concepto hasta incluir proteínas que median una gran variedad de procesos de ensamblaje, particularmente el plegamiento de proteínas.

Es importante saber que las chaperonas no proporcionan una información adicional para el plegamiento de las proteínas en su conformación tridimensional; ésta viene determinada exclusivamente por la secuencia de aminoácidos. Más bien, las chaperonas catalizan el plegamiento proteico ayudando al proceso de autoensamblaje. En concreto, se cree que su función es unirse y estabilizar las cadenas polipeptídicas no plegadas o los intermediarios parcialmente plegados que se forman en la ruta que dirige al estado de plegamiento correcto. En ausencia de chaperonas, las cadenas polipeptídicas no plegadas o parcialmente plegadas son inestables en la célula. La unión de las chaperonas estabiliza estas formas no plegadas y por tanto previenen el plegamiento incorrecto o la formación de agregados y permiten que la cadena polipeptídica adquiera una confomación activa.

Un buen ejemplo lo proporcionan las chaperonas que se unen a las cadenas polipeptídicas nacientes a la vez que se sintetizan en los ribosomas; de este modo previenen el plegamiento incorrecto o la agregación de la porción amino terminal del polipéptido antes de que la síntesis de éste finalice (**Fig. 9.23**). Probablemente, este tipo de interacción 100 a 300 aminoácidos tiene importancia en las proteínas en las que el extremo carboxilo terminal

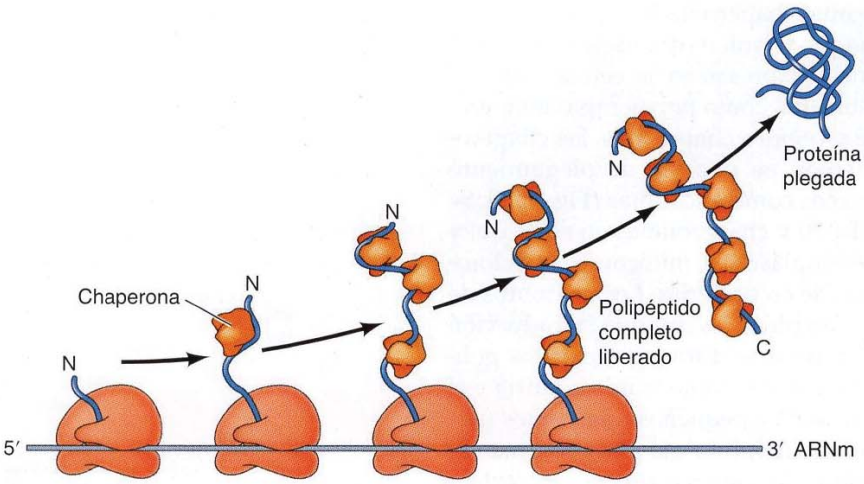


FIGURA 9.23 Papel de las chaperonas durante la traducción. Las chaperonas se unen al amino terminal (N) de la cadena polipeptídica en crecimiento, estabilizándolo en una configuración no plegada hasta que la síntesis de la cadena polipeptídica finaliza. La proteína completa es liberada del ribosoma y está preparada para plegarse en la conformación tridimensional adecuada.

(sintetizado en último lugar) es necesario para el plegamiento del extremo amino terminal. De esta manera, la chaperona unida estabiliza la porción amino terminal en una conformación extendida hasta que se sintetice el resto de la cadena polipeptídica y la proteína completa pueda plegarse correctamente. Las chaperonas también estabilizan los polipéptidos no plegados durante su transporte a los orgánulos subcelulares —por ejemplo, durante la migración de proteínas desde el citosol a la mitocondria (**Fig. 9.24**)—. Las proteínas se transportan a través de la membrana mitocondrial en una conformación parcialmente plegada estabilizada por chaperonas que se unen en el citosol. Las chaperonas del interior de la mitocondria facilitan la transferencia del polipéptido al atravesar la membrana y su plegamiento posterior en el interior del orgánulo. Además, las chaperonas participan en el ensamblaje de proteínas formadas por múltiples cadenas polipeptídicas, en el ensamblaje de estructuras macromoleculares (p. ej., nucleoplasmina).

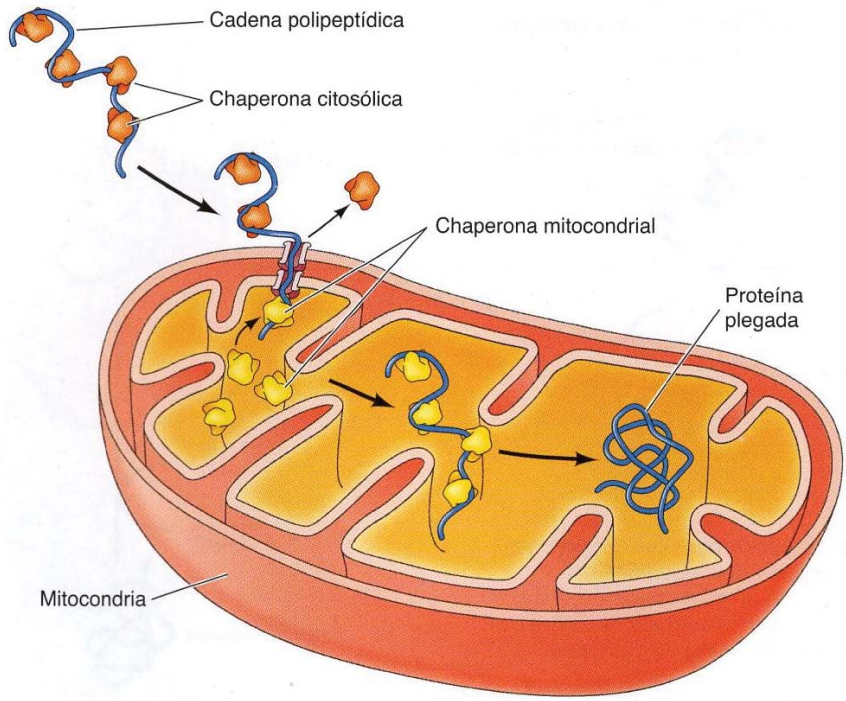


FIGURA 9.24 Papel de las chaperonas durante el transporte de proteínas. Un polipéptido parcialmente plegado es transportado desde el citosol a la mitocondria. Las chaperonas citosólicas estabilizan la configuración o conformación extendida. Las chaperonas mitocondriales facilitan el transporte y posterior plegamiento de la cadena polipeptídica dentro del orgánulo.

Muchas de las proteínas que actúan como chaperonas fueron inicialmente identificadas como proteínas de choque térmico (del inglés *heat-shock proteins*, Hsp), un grupo de proteínas que se expresan en las células ante determinadas circunstancias de estrés ambiental, como por ejemplo temperaturas elevadas. Existen dos familias de proteínas chaperonas, las chaperonas Hsp70 y las chaperoninas, que actúan en una vía de plegamiento proteico general tanto en células bacterianas como eucariotas (**Fig. 9.25**). Se encuentran miembros de las familias Hsp70 y chaperoninas en el citosol y en los orgánulos subcelulares (retículo endoplásmico, mitocondrias y cloroplastos) de las células eucariotas, además de en bacterias. Los miembros de la familia Hsp70 estabilizan las proteínas no plegadas durante la traducción (véase, por ejemplo, Fig. 9.23) y también durante el transporte de los polipéptidos a muchos de los orgánulos subcelulares, como la mitocondria y el retículo endoplásmico. Estas proteínas se unen a pequeños fragmentos (siete u ocho residuos de aminoácidos) de los polipéptidos no plegados, manteniendo la cadena polipeptídica en una configuración o conformación extendida, impidiendo la agregación.

La cadena polipeptídica no plegada es entonces transferida de chaperonas Hsp70 a una chaperonina, en cuyo interior tiene lugar el plegamiento proteico, dando lugar a una proteína correctamente plegada en su conformación tridimensional. Las chaperoninas consisten en múltiples subunidades proteicas organizadas en dos anillas apiladas para formar una estructura con dos cámaras. Las cadenas polipeptídicas no plegadas están resguardadas del citosol en el interior de la cámara de la chaperonina. En este ambiente aislado, puede proceder el plegamiento proteico mientras que se previene la agregación de los segmentos no plegados de la cadena polipeptídica con otros polipéptidos no plegados.

Tanto las bacterias como las células eucariotas también contienen familias adicionales de chaperonas, y el número de chaperonas es considerablemente mayor en eucariotas. Por ejemplo, una vía alternativa para el plegamiento de algunas proteínas en el citosol y el retículo endoplásmico de las células eucariotas implica la acción secuencial de miembros de las familias Hsp70 y Hsp90. La mayoría de los sustratos de plegamiento de Hsp90 son proteínas que están implicadas en la señalización celular, incluyendo receptores de hormonas esteroideas y una diversidad de proteínas quinasas.

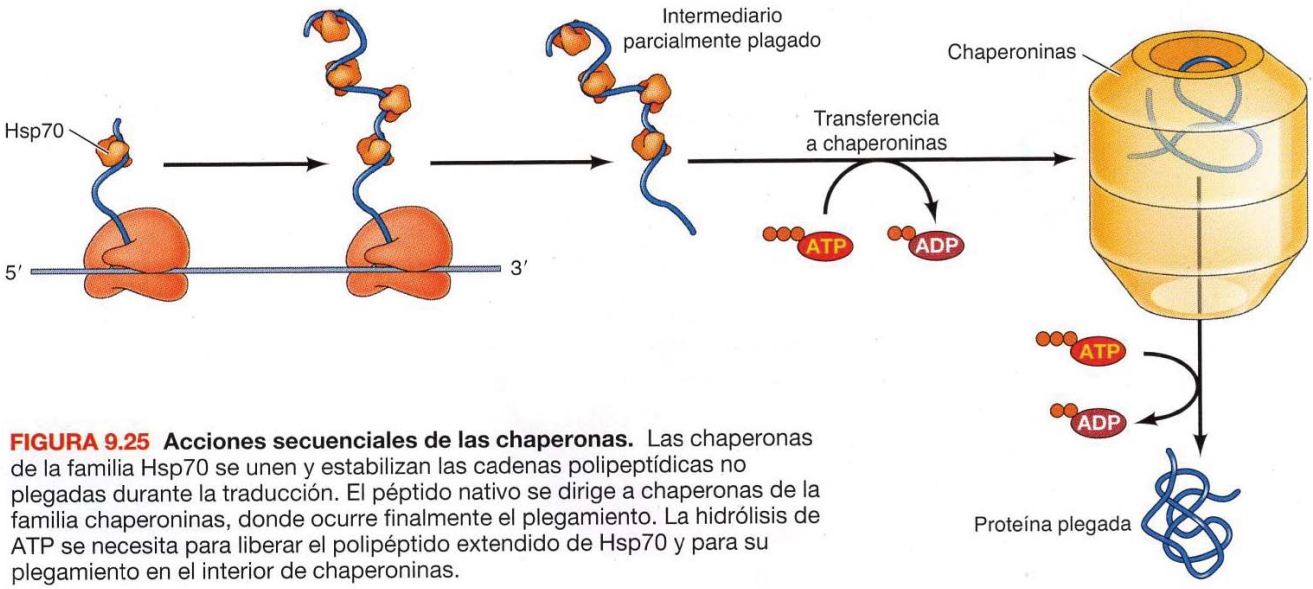


FIGURA 9.25 Acciones secuenciales de las chaperonas. Las chaperonas de la familia Hsp70 se unen y estabilizan las cadenas polipeptídicas no plegadas durante la traducción. El péptido nativo se dirige a chaperonas de la familia chaperoninas, donde ocurre finalmente el plegamiento. La hidrólisis de ATP se necesita para liberar el polipéptido extendido de Hsp70 y para su plegamiento en el interior de chaperoninas.

TABLA 9.2 Enfermedades representativas asociadas con la agregación de proteínas

Enfermedad	Proteína que se agrega
Enfermedades neurodegenerativas	
Enfermedad de Alzheimer	Amiloide-β
Enfermedad de Parkinson	α-sinucleína
Enfermedad de Huntington	Hungtintina
Esclerosis lateral amiotrófica	Superóxido dismutasa
Encefalopatías espongiformes	Proteína priónica
Enfermedades localizadas no neurodegenerativas	
Diabetes tipo 2	Amilina
Cataratas	Cristalinas
Amiloidosis localizada por inyección	Insulina
Enfermedades sistémicas	
Amiloide ligera-cadena amiloidosis	Cadena de inmunoglobulina ligera
Amiloidosis amiloide A	Proteína amiloide A sérica
Amiloidosis sistémica senil	Transtiretrina

Enfermedades por defecto de plegamiento de proteínas

Los defectos en el plegamiento de las proteínas son responsables de numerosas enfermedades frecuentes, denominadas conjuntamente **enfermedades por defecto de plegamiento de proteínas**. En algunos casos, el defecto de plegamiento de una proteína provoca una enfermedad como consecuencia de la reducción en los niveles de proteína funcional en una célula. Por ejemplo, la fibrosis quística está causada por las mutaciones en una proteína denominada CFTR (reguladora de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística), que se ocupa del transporte de iones cloruro a través de las membranas plasmáticas de varios tipos de células epiteliales, como las que revisten las vías respiratorias (v. «Medicina molecular», capítulo 14). La alteración del transporte de cloruro resultante de estas mutaciones provoca la obstrucción de las vías respiratorias por tapones espesos de moco, lo que da lugar a infecciones recidivantes y el fallecimiento de la mayoría de los pacientes por enfermedad pulmonar. La mayor parte de los casos de fibrosis quística se debe a la deleción de un aminoácido crítico (fenilalanina en la posición 508) en la proteína CFTR. La eliminación de este aminoácido altera las interacciones normales de la CFTR con las chaperonas en el retículo endoplásmico, provocando un plegamiento defectuoso de la proteína y menores concentraciones de CFTR funcional en las membranas plasmáticas de las células afectadas.

A diferencia de la fibrosis quística, en la cual los defectos en el plegamiento de proteínas llevan a una reducción en los niveles de proteína funcional, un gran número de las enfermedades asociadas a estos defectos, entre ellas la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la diabetes tipo 2, están asociadas a la agregación de proteínas con defectos de plegamiento (**Tabla 9.2**). En estas enfermedades, determinadas proteínas se pliegan de forma defectuosa para formar agregados fibrosos denominados amiloides. En contraste con sus conformaciones globulares normales, las proteínas con defectos de plegamiento se agregan para formar fibrillas de **amiloides** insolubles caracterizadas por estructuras en forma de láminas β (**Fig. 9.26A**). Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de placas amiloides en el encéfalo de los pacientes (**Fig. 9.26B**). Estas placas se forman como consecuencia de la agregación de la proteína amiloide-β (Aβ), que es un fragmento de escisión de una proteína de transmembrana denominada proteína precursora de amiloide. Tal como se indica en la Tabla 9.2, la formación de agregados de amiloides de otras proteínas se asocia con diversas enfermedades neurodegenerativas y con otros trastornos, como la diabetes

VÍDEO 9.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v9.3

Mecanismos de la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la formación de placas beta-amiloides y ovillos neurofibrilares, que impiden la comunicación neuronal.

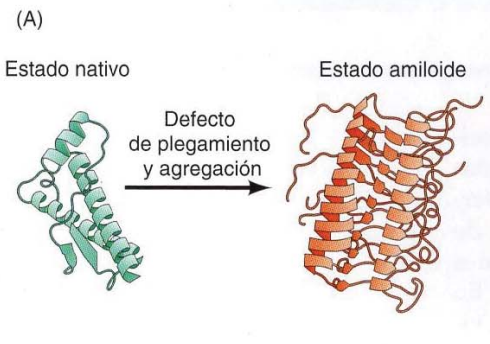
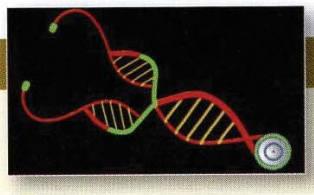


FIGURA 9.26 Agregación de proteínas y formación de amiloides. (A) Una proteína globular nativa se pliega de forma defectuosa y se agrega para formar una fibrilla de amiloide, con estructura de lámina β. (B) Placa amiloide del encéfalo de un paciente con enfermedad de Alzheimer.



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedad de Alzheimer

Enfermedad

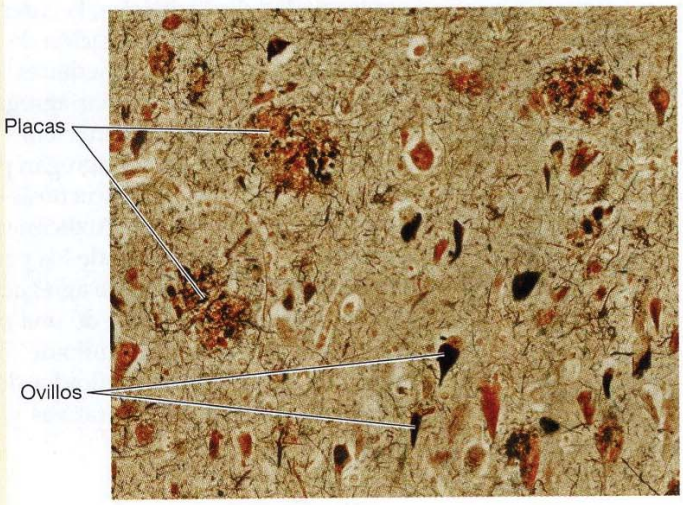
La enfermedad de Alzheimer debe su nombre al psiquiatra bávaro Alois Alzheimer quien, en 1906, reconoció lesiones diferenciadas en el tejido encefálico de una mujer que falleció a consecuencia de un trastorno mental con síntomas que incluían pérdida de memoria. Se trata de una forma progresiva de demencia que destruye gradualmente la memoria, el razonamiento y la capacidad de realizar las actividades cotidianas. La enfermedad es letal en sus últimas fases, en las cuales los pacientes afectados están encamados, incapaces de comunicarse y completamente dependientes de otras personas para sus cuidados. La enfermedad de Alzheimer afecta a más de 5 millones de estadounidenses y es la sexta causa de muerte en los Estados Unidos, con más de 500.000 decesos al año. La enfermedad suele diagnosticarse en personas de más de 65 años y, según las estimaciones, en torno al 11% de los miembros de este grupo de edad padece la dolencia.

Base molecular y celular

Las dos lesiones identificadas por el Dr. Alois Alzheimer y hoy reconocidas como signos distintivos de la enfermedad que lleva su nombre son los ovillos neurofibrilares y las placas amiloides (véase figura). Los ovillos neurofibrilares son agregados con defectos de plegamiento de una proteína denominada tau, que normalmente se asocia con los microtúbulos. Las placas amiloides son agregados de proteína amiloide β (Aβ) con defecto de plegamiento, que es un fragmento de escisión de una proteína de transmembrana denominada proteína precursora de amiloides (PPA). La función de Aβ en la enfermedad ha sido indicada por estudios de casos hereditarios raros de Alzheimer. Tres genes responsables de la enfermedad de Alzheimer hereditaria provocan un aumento en la producción de Aβ, ya sea a consecuencia de mutaciones estructurales en la PPA o de proteasas responsables de la escisión de PPA, lo que liga directamente la Aβ con el desarrollo de la enfermedad. Además, el papel de la Aβ está avalado por modelos de ratones transgénicos, en los que la sobreproducción de Aβ produce neurodegeneración y patologías similares a la enfermedad humana. Sin embargo, el mecanismo por el cual la Aβ provoca neurodegeneración aún debe establecerse. Las investigaciones actuales indican que los agregados solubles de Aβ con defectos de plegamiento, que son precursores de las placas amiloides, son tóxicos para las neuronas y, según se piensa, son estos agregados, y no las placas amiloides en sí, los posibles agentes primarios responsables del desarrollo de la enfermedad.

Prevención y tratamiento

Actualmente no existe cura ni formas de prevenir la enfermedad de Alzheimer. Los tratamientos se limitan a ayudar a los pacientes a mantener sus funciones mentales y a retrasar la progresión de la enfermedad. En la actualidad, para esta dolencia se utilizan cuatro fármacos que regulan la actividad de los neurotransmisores. Estos fármacos pueden ayudar a conservar la función cerebral, pero son eficaces sólo en la mitad, aproximadamente, de los pacientes de Alzheimer y únicamente retrasan la progresión del mal entre seis meses y un año. Las investigaciones se centran en el desarrollo de fármacos que interferirían directamente con la patogenia de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, al inhibir la producción de Aβ o interferir en la agregación de Aβ, aunque la obtención de tales fármacos se mantiene todavía como un objetivo futuro.



Placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el encéfalo de un paciente con enfermedad de Alzheimer.

tipo 2 y las amiloidosis sistémicas. Es probable que la agregación de proteínas desempeñe papeles distintos en el desarrollo de diferentes enfermedades. Por ejemplo, las amiloidosis sistémicas constituyen un grupo de enfermedades en las que diferentes proteínas (como cadenas ligeras de inmunoglobulinas) forman grandes cantidades de agregados de amiloides que se distribuyen por el organismo y se depositan en diversos órganos. En este caso, la desorganización de la estructura y la función de los órganos vi-

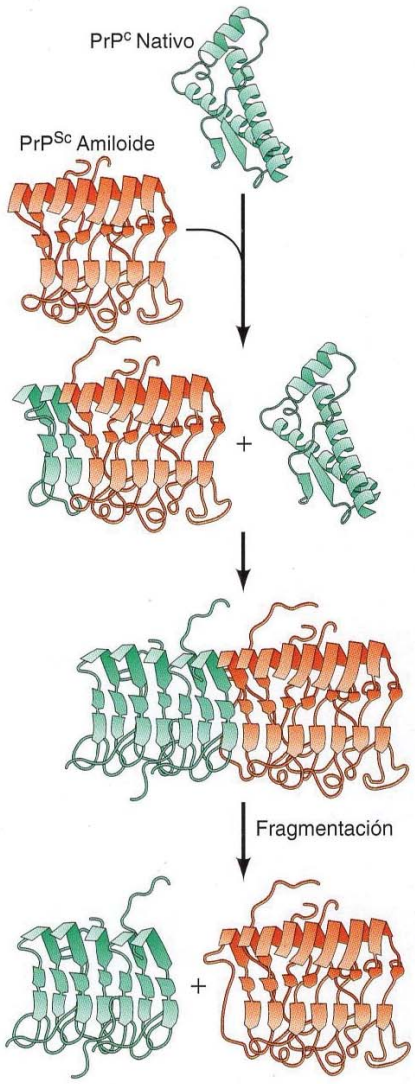


FIGURA 9.27 Propagación de los priones. La proteína priónica PrP^{Sc} se propaga induciendo defectos de plegamiento de la PrP^{C} nativa en el estado PrP^{Sc} amiloide. Las fibras de amiloide en crecimiento se fragmentan para producir nuevas partículas PrP^{Sc}.

tales (por ejemplo, el corazón y los riñones) por estos agregados de amiloides produce la enfermedad. En cambio, la función de la formación de amiloides en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas resulta menos clara. Estas enfermedades pueden derivarse del daño celular inducido por proteínas con defectos de plegamiento, y no por la formación masiva de agregados de amiloides. Por ejemplo, las evidencias de que se dispone actualmente apuntan a que la enfermedad de Alzheimer puede derivarse de la toxicidad de formas solubles de oligómeros A, y no estar provocada por la acumulación de placas amiloides insolubles.

Los estudios de un grupo de enfermedades neurodegenerativas transmisibles raras, denominadas encefalopatías espongiformes transmisibles, llevó a la caracterización de los **priones** como proteínas con defectos de plegamiento con capacidad de autorreplicación. Estas enfermedades comprenden, entre otras, el *scrapie* en las ovejas, la enfermedad de las vacas locas, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y el kuru. A diferencia de las bacterias y los virus, se descubrió que los agentes infecciosos responsables de estas enfermedades son resistentes al tratamiento con agentes que inactivan los ácidos nucleicos, como las nucleasas o la irradiación UV, pero eran sensibles a tratamientos que degradaban las proteínas. En 1982, Stanley Prusiner aisló una partícula infecciosa, compuesta sólo por proteínas, que provocaba el *scrapie*. A esta partícula le dio el nombre de prion, como designación de una partícula infecciosa proteinácea carente de ácidos nucleicos. El carácter infeccioso de los priones se basa en la formación de amiloides por parte de la proteína priónica, PrP. La PrP se expresa en las células de mamíferos en su forma normal en hélice α, y recibe el nombre de PrP^{C}. En su forma infecciosa, la PrP forma una estructura de amiloide con defectos de plegamiento, denominada PrP^{Sc}. Es importante observar que la PrP^{Sc} puede propagarse induciendo defectos de plegamiento de las proteínas PrP^{C} en el estado PrP^{Sc} amiloide (**Fig. 9.27**). Así pues, la PrP^{Sc} puede infectar una célula y «replicarse» mediante la inducción de la formación de amiloide autocatalítica de PrP^{C} endógena, una nueva forma de propagación que no necesita ácido nucleico en la partícula infecciosa. Debe reseñarse que las proteínas que forman los amiloides en las enfermedades neurodegenerativas indicadas anteriormente (p. ej., enfermedad de Alzheimer) se asemejan a los priones en que las proteínas con defectos de plegamiento también estimulan otros de estos defectos y la agregación. Por tanto, las enfermedades priónicas pueden comprender estas formas comunes de enfermedad neurodegenerativa.

Enzimas que catalizan el plegamiento proteico

Además de la chaperonas, que facilitan el plegamiento de las proteínas mediante la unión y estabilización de intermediarios parcialmente plegados, las células también contienen al menos dos tipos de enzimas que catalizan el plegamiento de proteínas mediante la rotura y formación de nuevos enlaces covalentes. La formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína

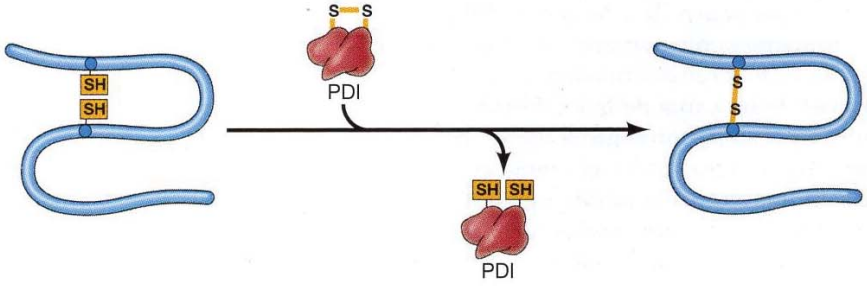


FIGURA 9.28 Actividad de la proteína disulfuro isomerasa. La proteína disulfuro isomerasa (PDI) cataliza la formación de puentes disulfuro a través de la transferencia de equivalentes de oxidación a su sustrato.

es importante en la estabilidad de la estructura plegada de muchas proteínas (véase Fig. 2.16). La **proteína disulfuro isomerasa** (PDI), descubierta por Christian Anfinsen en 1963, cataliza la formación de puentes disulfuro (**Fig. 9.28**). En las proteínas que contienen múltiples residuos del aminoácido cisteína, la PDI desempeña un papel importante promoviendo el intercambio rápido entre parejas de puentes disulfuro, para que la proteína adquiera el patrón de puentes disulfuro compatible con una conformación estable. Los puentes disulfuro son especialmente abundantes en proteínas secretadas y algunas proteínas de membrana, porque el citosol contiene agentes reductores que mantienen los residuos de cisteína en la forma reducida (—SH), impidiendo la formación del puente disulfuro (S—S). En células eucariotas, los puentes disulfuro generalmente se forman en el retículo endoplásmico, en cuyo lumen hay un ambiente oxidante. La PDI es una chaperona crítica y un catalizador del plegamiento proteico en el retículo endoplásmico y es una de las proteínas más abundantes en dicho orgánulo.

La segunda enzima con un papel importante en el plegamiento de proteínas cataliza la isomerización de los enlaces peptídicos donde participa el aminoácido prolina (**Fig. 9.29**). La prolina es un aminoácido especial en el que el equilibrio entre las conformaciones *cis* y *trans* del enlace peptídico que precede a un residuo de prolina está ligeramente desplazado hacia la conformación *trans*. Por el contrario los enlaces peptídicos formados entre otros aminoácidos se encuentran casi siempre en una conformación *trans*. La isomerización entre las configuraciones *cis* y *trans* de los enlaces peptídicos en los que interviene la prolina, que podría representar un paso limitante del plegamiento de proteínas, la cataliza la enzima **peptidil prolil isomerasa**. Esta enzima está ampliamente distribuida tanto en células procariotas como eucariotas y cataliza el plegamiento de varias proteínas.

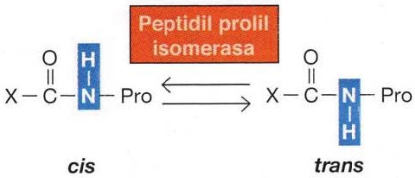


FIGURA 9.29 Actividad de la peptidil prolil isomerasa. La peptidil prolil isomerasa cataliza la isomerización entre la conformación *cis* y *trans* de los enlaces peptídicos en los que interviene la prolina.

Escisión de proteínas

La escisión de las cadenas polipeptídicas (**proteólisis**) es una etapa importante en la maduración de muchas proteínas. Un ejemplo sencillo es la eliminación de la metionina inicial del extremo amino terminal de muchos polipéptidos, proceso que ocurre al principio de la traducción, antes de que la cadena polipeptídica se sintetice completamente. La adición de nuevos grupos químicos al residuo amino terminal del polipéptido, por ejemplo, grupos acetilo o cadenas de ácidos grasos, ocurre con frecuencia.

Las modificaciones proteolíticas de los extremos amino también tienen un papel fundamental en la translocación de muchas proteínas a través de las membranas celulares, incluyendo la secreción de proteínas tanto en células bacterianas como eucariotas, así como las proteínas que van a formar parte de la estructura de la membrana plasmática, lisosomas, mitocondrias y cloroplastos en células eucariotas. Estas proteínas son marcadas con secuencias amino terminales para transportarse a sus destinos finales, y estas secuencias son eliminadas de la cadena polipeptídica por escisión proteolítica cuando atraviesan las membranas. Por ejemplo, la **secuencia señal** amino terminal, formada aproximadamente por 20 aminoácidos, marca las proteínas que se dirigen a la membrana plasmática en bacterias, o al retículo endoplásmico en células eucariotas, mientras ocurre la traducción (**Fig. 9.30**). La secuencia señal, formada predominantemente por aminoácidos hidrofóbicos, se inserta en la membrana cuando emerge del ribosoma. El resto de la cadena polipeptídica pasa a través de un canal de la membrana a medida que es sintetizada. Esta secuencia señal posteriormente es escindida por una proteasa de membrana específica (**peptidasa señal**), liberándose la proteína madura. En células eucariotas, la translocación al retículo endoplásmico de cadenas polipeptídicas nacientes es el primer nivel en el marcaje de proteínas que se destinarán a la secreción, a formar parte de la mem-

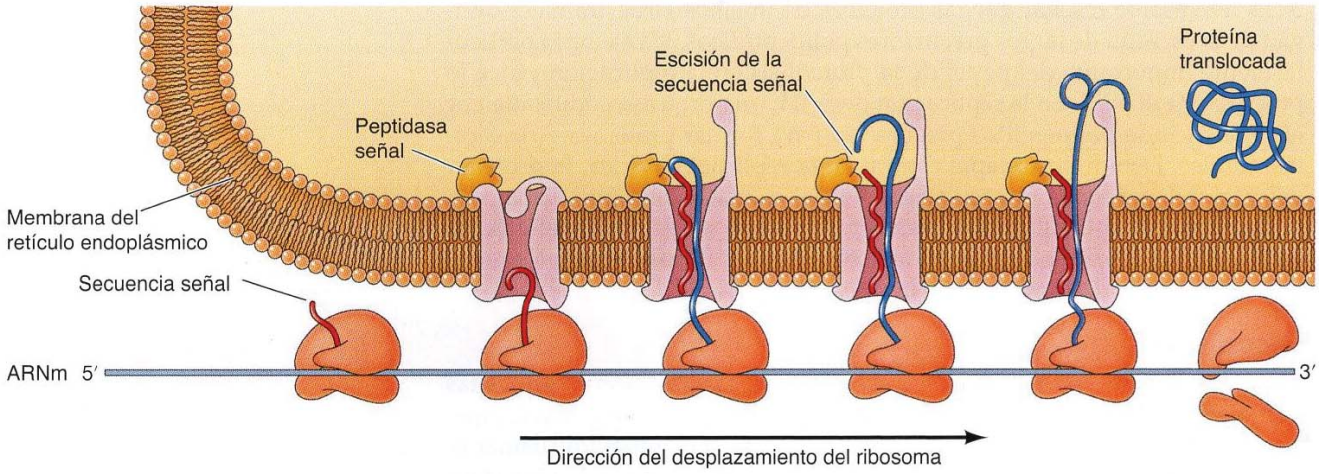


FIGURA 9.30 Papel de las secuencias señal en la translocación a través de la membrana. Las secuencias señal dirigen la translocación de las cadenas polipeptídicas a través de la membrana plasmática de bacterias o hacia el interior del retículo endoplásmico en las células eucariotas (véase dibujo). Esta secuencia señal, una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica se inserta en un canal de la membrana inmediatamente tras su síntesis en el ribosoma. El resto de la proteína es translocada a través del canal y la secuencia señal es eliminada por la actividad de una peptidasa señal, liberándose una proteína madura y translocada.

brana plasmática o se incorporarán a los lisosomas. Los mecanismos que dirigen el transporte de proteínas a sus destinos, así como el papel de otras secuencias señal que dirigen las proteínas al interior de las mitocondrias y cloroplastos, se discutirán en los Capítulos 11 y 12.

Otro ejemplo importante de procesamiento proteolítico es la formación de enzimas u hormonas funcionalmente activas, mediante escisión de precursores inactivos de mayor tamaño. La insulina se sintetiza como un precursor polipeptídico más grande y representa un ejemplo clásico. La insulina se forma a partir de dos escisiones. El precursor inicial (preproinsulina) contiene una secuencia señal amino terminal que dirige la cadena polipeptídica hacia el retículo endoplásmico (**Fig. 9.31**). La eliminación de la secuencia señal durante la translocación al retículo endoplásmico produce un segundo precursor, llamado proinsulina. Este precursor se transforma finalmente en insulina, formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, previa escisión proteolítica de un péptido interno. Otras proteínas activadas mediante mecanismos de escisión similares son las enzimas digestivas y las proteínas que participan en la coagulación sanguínea, y una cascada de proteasas que regulan la muerte celular programada en los animales.

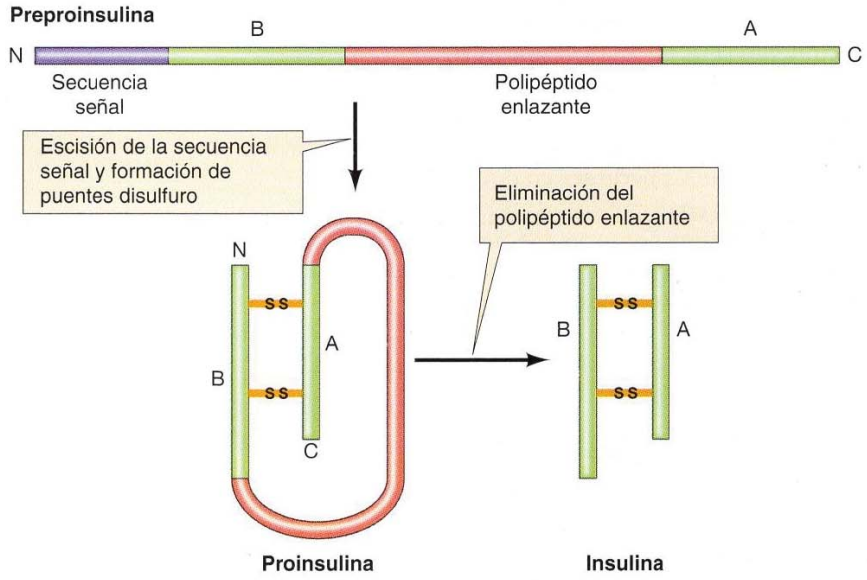


FIGURA 9.31 Procesamiento proteolítico de la insulina. La molécula activa de insulina consta de dos subunidades polipeptídicas (A y B) unidas por puentes disulfuro. Es sintetizada como un polipéptido precursor (preproinsulina) que contiene una secuencia señal amino terminal que se eliminará durante la transferencia de la cadena polipeptídica al retículo endoplásmico. Esta escisión origina un segundo precursor (proinsulina), que es transformado en insulina por un mecanismo de proteólisis mediante el que se elimina un fragmento interno del polipéptido.

Es interesante reseñar que las proteínas de muchos virus animales derivan de la escisión de largos precursores polipeptídicos. Un ejemplo particularmente importante del papel de la proteólisis en la replicación vírica lo proporciona el VIH. En la replicación del VIH, una proteasa codificada por el virus escinde polipéptidos precursores para formar proteínas víricas estructurales. Debido a su papel central en la replicación vírica, la proteasa del VIH (además de la transcriptasa inversa) es una importante diana para el desarrollo de drogas usadas para el tratamiento del SIDA. En efecto, los inhibidores de la proteasa son en la actualidad los fármacos más efectivos que se utilizan para combatir la enfermedad.

Glicosilación

Muchas proteínas, particularmente en células eucariotas, son modificadas por la adición de carbohidratos en un proceso conocido como **glicosilación**. Las proteínas a las que se les ha añadido una cadena de glúcidos (llamadas **glicoproteínas**) normalmente son secretadas o se localizan en la superficie celular, aunque algunas proteínas nucleares o citosólicas también están glicosiladas. Los carbohidratos de las glicoproteínas tienen funciones importantes en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, en la decisión del destino de las proteínas a su compartimento intracelular, y como sitio de reconocimiento en las interacciones célula-célula.

Las glicoproteínas se clasifican en dos tipos: *N*-glicoproteínas y *O*-glicoproteínas, dependiendo del sitio de unión de la cadena de carbohidratos (**Fig. 9.32**). En las *N*-glicoproteínas, los carbohidratos se unen al átomo de nitrógeno de la cadena lateral del aminoácido asparragina. En las *O*-glicoproteínas, el átomo de oxígeno de los aminoácidos serina o treonina es el sitio de unión de la cadena glucídica. Los azúcares que se unen directamente a estos sitios son normalmente *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina respectivamente. Por otra parte, los residuos de manosa se pueden unir a residuos de triptófano en algunas proteínas a través de enlaces entre dos átomos de carbono.

La mayoría de las glicoproteínas de las células eucariotas será destinada a la secreción o a formar parte de la membrana plasmática. Estas proteínas se transfieren normalmente al interior del retículo endoplásmico (previa escisión de la secuencia señal) mientras la proteína es sintetizada. La glicosilación se inicia también en el retículo endoplásmico antes de que termine la traducción de la proteína. El proceso comienza con la transferencia de un oligosacárido común compuesto por 14 residuos de monosacárido (dos *N*-acetilglucosaminas, nueve manosas, y tres glucosas) a un residuo de asparragina de la cadena polipeptídica en crecimiento (**Fig. 9.33**). El oligosacárido se localiza en la membrana del retículo endoplásmico unido a un lípido transportador (**dolicol fosfato**). Este oligosacárido es transferido como una unidad completa a un residuo de asparragina (Asn) aceptora, que forma parte de la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido distinto de prolina). Como describimos en el capítulo 11, el oligosacárido común de las *N*-glucoproteínas se modifica entonces mediante la eliminación y adición de residuos de hidratos de carbono, de modo que las proteínas pueden contener en último término varios oligosacáridos distintos.

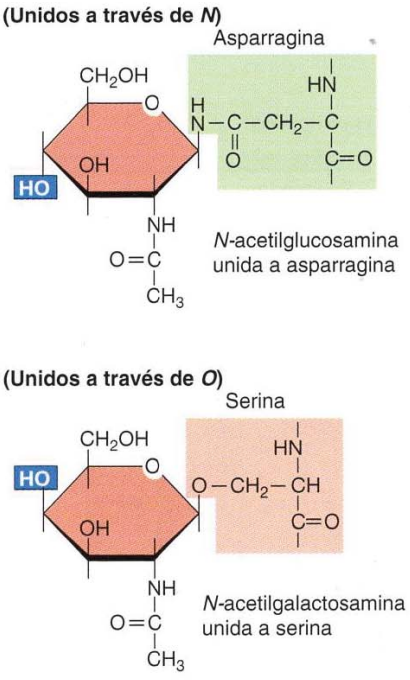


FIGURA 9.32 Anclaje de carbohidratos para formar glicoproteínas. Las cadenas de azúcares de las *N*-glicoproteínas están unidas a un residuo de asparragina, mientras que los de las *O*-glicoproteínas se unen a serina (véase dibujo) o a treonina. Los azúcares unidos a los aminoácidos son, normalmente, *N*-acetilglucosamina (unidos a través de *N*) o *N*-acetilgalactosamina (unidos a través de *O*).

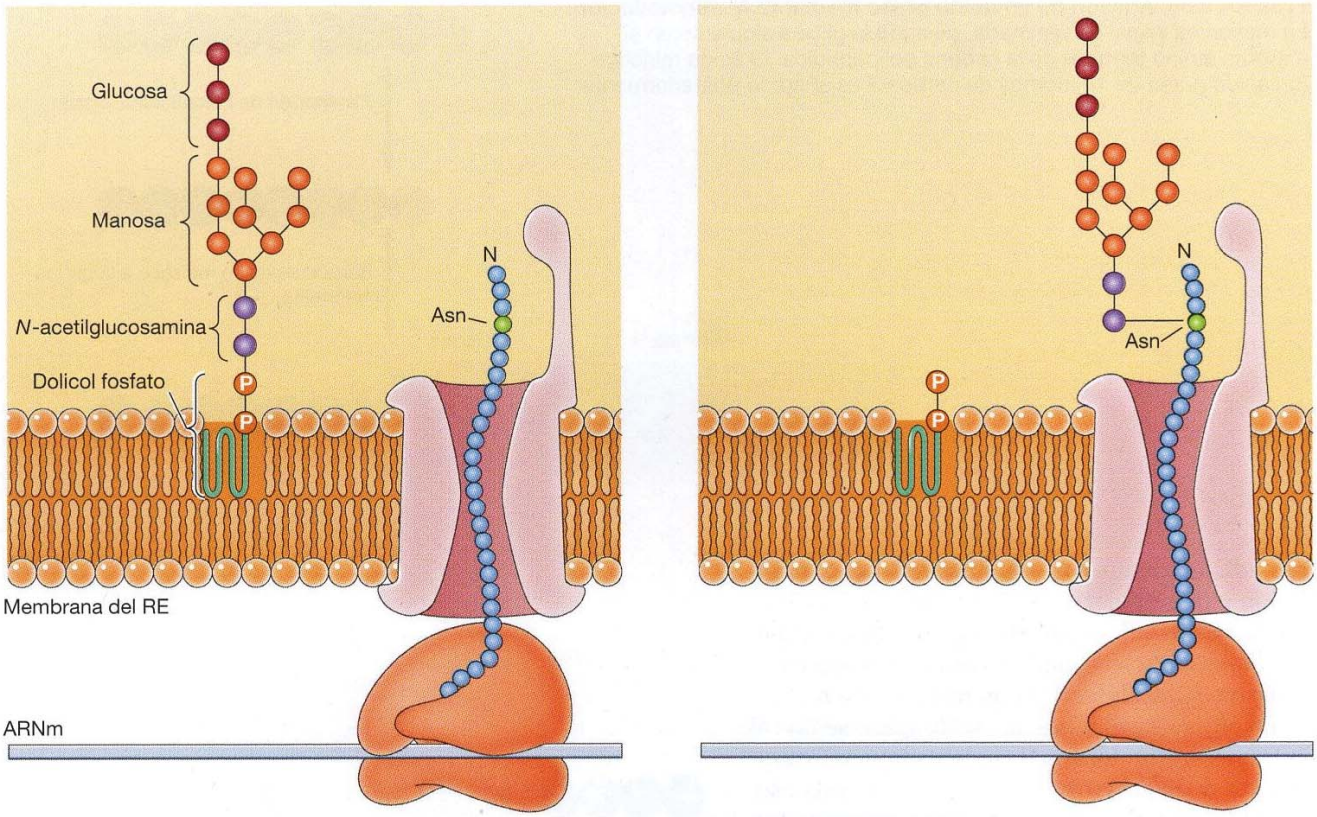


FIGURA 9.33 Síntesis de *N*-glicoproteínas. La primera etapa de la glicosilación es la adición, en el retículo endoplásmico (RE), de un oligosacárido formado por 14 residuos de monosacáridos a la cadena polipeptídica en crecimiento. El oligosacárido (formado por dos *N*-acetilglucosaminas, nueve manosas y tres glucosas) se une a un lípido (dolicol fosfato) en la membrana del retículo endoplásmico. El oligosacárido es transferido desde el dolicol fosfato a un residuo de asparragina de la cadena polipeptídica.

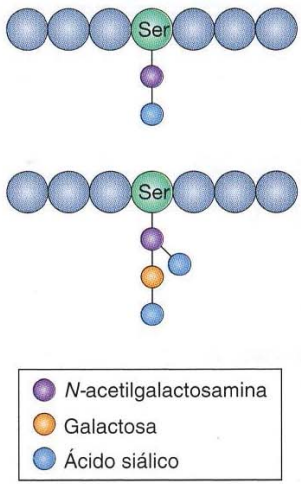


FIGURA 9.34 Ejemplos de *O*-oligosacáridos. Los oligosacáridos ligados a *O* normalmente están formados por pocos residuos de monosacárido, que se añaden uno a uno.

Los *O*-oligosacáridos se añaden a las proteínas en el aparato de Golgi. A diferencia de los ligados a *N*, los *O*-oligosacáridos se forman por la adición de un único azúcar compuesto por pocos residuos de monosacárido (**Fig. 9.34**). Sin embargo, algunos *O*-oligosacáridos son cadenas largas que contienen muchos azúcares, tales como los proteoglicanos secretados de la matriz extracelular (según se expone en el Capítulo 15). Muchas proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo una gran variedad de factores de transcripción, también se modifican por la adición de residuos únicos de *N*-acetilglucosamina formando *O*-glicoproteínas, proceso catalizado por un sistema enzimático diferente en el citosol. La glicosilación de estas proteínas citoplásmicas y nucleares se cree que juega un papel en la regulación de sus actividades, aunque las consecuencias de la *O*-glicosilación siguen sin comprenderse por completo.

Anclaje de lípidos

Algunas proteínas en las células eucariotas se modifican mediante el anclaje de moléculas lipídicas a la cadena polipeptídica. Estas modificaciones con frecuencia marcan y anclan estas proteínas a la membrana plasmática, siendo el lípido por su naturaleza hidrofóbica el que se inserta en la membrana (véase Fig. 2.34). En las proteínas ancladas a la cara citosólica de la membrana de las células eucariotas son comunes tres tipos de modificaciones

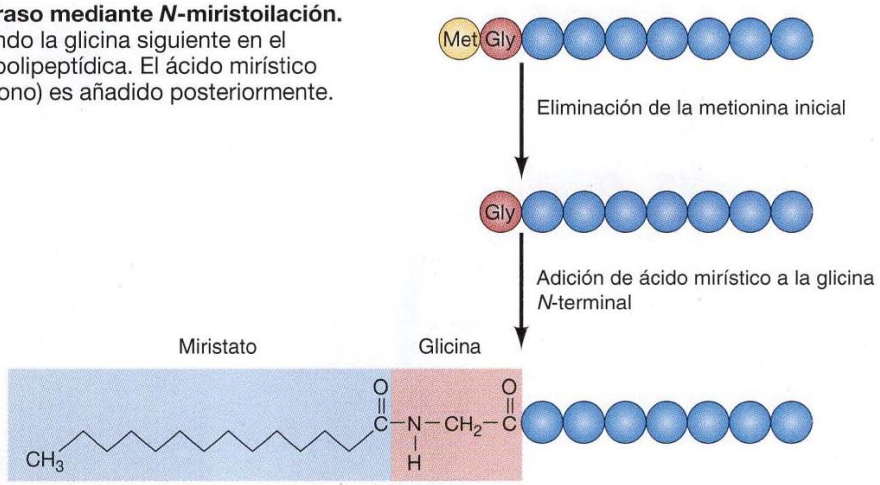


FIGURA 9.35 Adición de un ácido graso mediante *N*-miristoilación. La metionina inicial es eliminada, dejando la glicina siguiente en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica. El ácido mirístico (un ácido graso de 14 átomos de carbono) es añadido posteriormente.

por adición de lípidos —*N*-miristoilación, prenilación y palmitoilación—. Un cuarto tipo de modificación, la adición de glicolípidos, tiene un papel importante en el anclaje de algunas proteínas a la cara extracelular de la membrana plasmática.

En algunas proteínas, un ácido graso se une al extremo amino terminal de la cadena en crecimiento durante la traducción. En este proceso, llamado **N-miristoilación**, el ácido mirístico (un ácido graso de 14 átomos de carbono) se une a un residuo N-terminal de glicina (**Fig. 9.35**). La glicina es con frecuencia el segundo aminoácido incorporado a la cadena polipeptídica durante la traducción; el residuo iniciador de metionina es eliminado por proteólisis antes de la adición del ácido graso. Muchas proteínas que son modificadas por *N*-miristoilación están asociadas a la cara interna de la membrana plasmática; el papel del ácido graso en esta asociación se conoce a partir de experimentos que utilizan proteínas mutadas en las que la glicina N-terminal es sustituida por alanina. Esta sustitución impide la unión del ácido mirístico y bloquea la función de la proteína mutada impidiendo su anclaje a la membrana.

Los lípidos también se pueden anclar a las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína, serina y treonina. Un ejemplo importante de este tipo de modificación es la **prenilación**, en la que un tipo específico de lípidos (grupos prenilo) se anclan a átomos de azufre de las cadenas laterales de los residuos de cisteína localizados cerca del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica (**Fig. 9.36**). Muchas proteínas asociadas a la membrana plasmática que participan en el control del crecimiento y diferenciación celulares son modificadas por esta vía, incluyendo las proteínas del oncogén *ras*, que son responsables del crecimiento celular incontrolado de muchos tu-

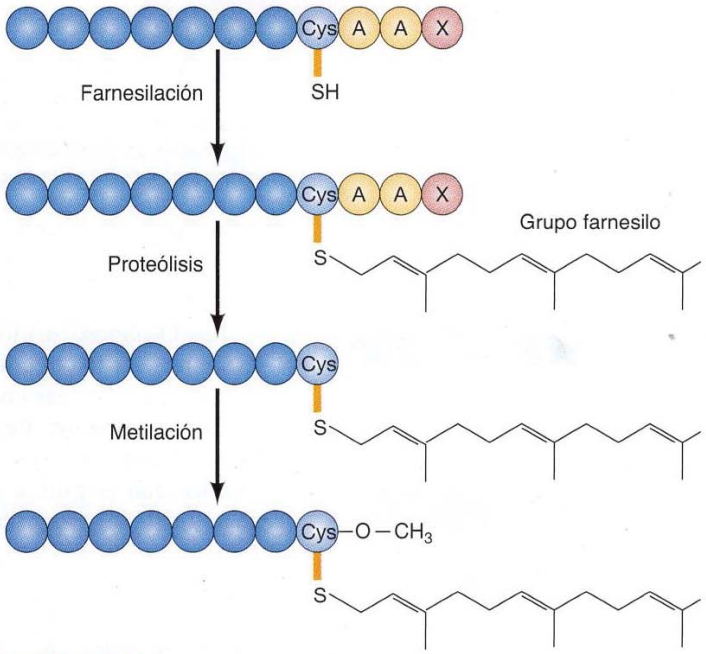


FIGURA 9.36 Prenilación de una cisteína en el extremo carboxilo terminal. El tipo de prenilación mostrada en el dibujo ocurre en proteínas codificadas por el oncogén *ras* y en proteínas de la envuelta nuclear (láminas nucleares). Estas proteínas terminan en un residuo de cisteína seguida de dos aminoácidos alifáticos (A) y otro aminoácido designado con la letra X, en el extremo carboxilo terminal. La primera etapa de la modificación es la adición de un grupo farnesilo, compuesto por 15 átomos de carbono, a la cadena lateral de la cisteína (farnesilación). En segundo lugar, ocurre la eliminación proteolítica de los tres aminoácidos que siguen a la cisteína, y, finalmente, la metilación de ésta que ahora se encuentra en el extremo carboxilo terminal.

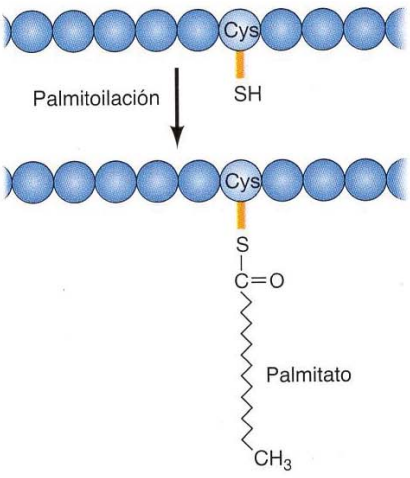


FIGURA 9.37 Palmitoilación. El palmitato (un ácido graso de 16 átomos de carbono) es añadido a la cadena lateral de un residuo interno de cisteína.

mores humanos (véase Cap. 19). La prenilación de estas proteínas ocurre en tres etapas. Primero, el grupo prenilo se añade a una cisteína localizada a una distancia de tres aminoácios del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. Los grupos prenilo añadidos en esta reacción pueden ser el farnesilo (15 carbonos, como se muestra en la Fig. 9.36) o geranilgeranilo (20 carbonos). Los aminoácidos siguientes a la cisteína modificada son eliminados, dejando la cisteína en el extremo carboxilo terminal. Finalmente, un grupo metilo se añade al grupo carboxilo de la cisteína terminal.

El tercer tipo de modificación por adición de ácidos grasos es la **palmitoilación**, en la que el ácido palmítico (un ácido graso de 16 átomos de carbono) se une a los átomos de azufre de la cadena lateral de residuos internos de cisteína (**Fig. 9.37**). Como la *N*-miristoilación y la prenilación, la palmitoilación tiene un papel importante en el anclaje de algunas proteínas a la cara citosólica de la membrana plasmática.

Finalmente, los lípidos unidos a oligosacáridos (**glicolípidos**) se añaden a los grupos carboxilo terminal de algunas proteínas, sirviendo como anclaje de estas proteínas a la superficie externa de la membrana plasmática. Debido a que los glicolípidos unidos a estas proteínas contienen fosfatidilinositol, normalmente se llaman **«anclas» de glicosilfosfatidilinositol,** o **GPI**, (**Fig. 9.38**). Las porciones oligosacáridas del glicosilfosfatidilinositol se unen al grupo carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas. El grupo inositol del fosfatidilinositol se une a su vez al oligosacárido y, por tanto, el grupo carbohidrato actúa como puente entre la parte de proteínas y las cadenas de ácidos grasos del fosfolípido. El glicosilfosfatidilinositol se sintetiza y une a las proteínas como una unidad en el retículo endoplásmico. Esta adición se acompaña de la escisión de un péptido de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. La proteína modificada será transportada a la superficie celular, donde las cadenas de ácidos grasos del ancla de glicosilfosfatidilinositol median su unión a la membrana plasmática.

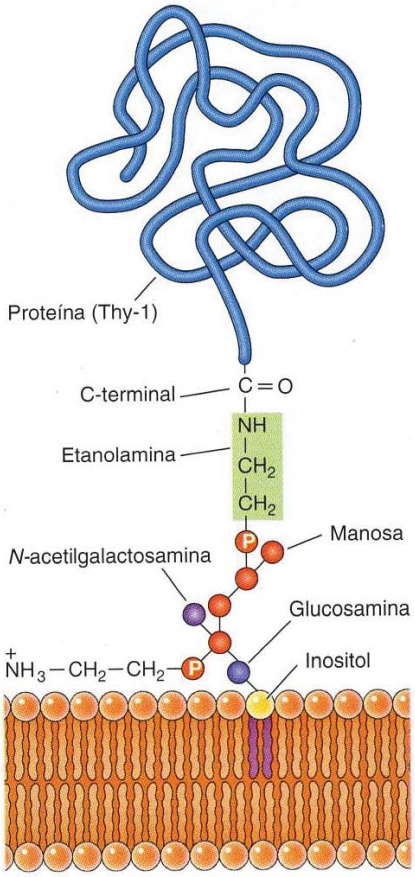


FIGURA 9.38 Estructura de un ancla GPI. El glicosilfosfatidilinositol, unido al carboxilo terminal, ancla la proteína a la membrana plasmática. Éste se une al aminoácido en el extremo carboxilo terminal a través de una etanolamina, que está unida a un oligosacárido formado por residuos de manosa, *N*-acetilgalactosamina y glucosamina. El oligosacárido se une a su vez al grupo inositol del fosfatidilinositol. Los dos ácidos grasos del fosfolípido se insertan dentro de la membrana plasmática. El glicosilfosfatidilinositol del dibujo pertenece a la proteína Thy-1 de una rata.

Regulación de la función de las proteínas

Una función importante de muchas proteínas es actuar como enzimas, necesarias para catalizar casi todas las reacciones biológicas. La regulación de la actividad enzimática tiene un papel clave en el comportamiento celular. Esto se logra, en parte, al nivel de la expresión génica, que determina la cantidad de una enzima (proteína) sintetizada en la célula. Un nivel posterior de regulación se consigue mediante el control de la función de las proteínas, lo cual permite a la célula regular no sólo la cantidad sino también la función de sus proteínas. La regulación de las actividades de algunas proteínas implicadas en la transcripción y traducción ya se ha expuesto en este capítulo y en el precedente, y muchos más ejemplos de regulación de la función de las proteínas en el control del comportamiento celular se expondrán a lo largo del desarrollo de este libro. En este apartado se discuten los tres mecanismos generales por los cuales se regulan las actividades de las proteínas celulares.

Regulación por pequeñas moléculas

La mayoría de las enzimas son reguladas por cambios en su conformación que provocan modificaciones en su actividad catalítica. En muchos casos estos cambios de conformación se producen por la unión de pequeñas moléculas, como aminoácidos o nucleótidos, que regulan la actividad enzimática. Este tipo de regulación es normalmente responsable del control de vías metabólicas en las que hay mecanismos de inhibición *feedback* (retroinhibición). Por ejemplo, los productos finales de muchas rutas enzimáticas (p. ej., aminoácidos) inhiben la enzima que cataliza la primera etapa de su síntesis; de esta manera se asegura una cantidad adecuada de producto y a su vez se evita su producción en exceso (**Fig. 9.39**). La retroinhibición es un ejemplo de **regulación alostérica** en la que una molécula reguladora se une a un sitio de la enzima distinto del centro activo (*alo* = otro; *estérico* = sitio). La unión de esta molécula reguladora modifica la conformación de la proteína, con lo cual se produce un cambio en su centro activo, afectando a la actividad enzimática (véase Fig. 2.29). Muchos factores de transcripción (vistos en el Cap. 8) también están regulados por la unión de pequeñas moléculas. Por ejemplo, la unión de lactosa al represor *E. coli lac* induce un cambio conformacional que impide que el represor se adhiera al ADN (véase Fig. 8.7). En las células eucarióticas, las hormonas esteroideas controlan de forma similar la expresión génica uniéndose a proteínas reguladoras de la transcripción.

La regulación de los factores de traducción como eEF-1α por la unión del GTP (véase Fig. 9.14) es un ejemplo de otro mecanismo común de regulación de la actividad de proteínas intracelulares. En este caso, la forma unida a GTP es la conformación activa, mientras que en la unida a GDP la proteína es inactiva. Muchas proteínas celulares también son reguladas por la unión a GTP o GDP. Un ejemplo son las proteínas codificadas por el oncogén *ras*, muy estudiadas por su papel en el control de la proliferación celular y en los cánceres humanos. Los análisis mediante cristalografía de rayos X de estas proteínas revelan diferencias conformacionales sutiles pero muy importantes entre la forma inactiva unida a GDP y la forma activa unida a GTP (**Fig. 9.40**). Estas pequeñas diferencias en la conformación de la proteína determinan que la proteína Ras (en la forma activa unida a GTP) pueda interaccionar con su molécula diana, e inducir la división celular. La importancia de estas diferencias en la conformación de la proteína se muestra en el hecho de que mutaciones en los genes *ras* contribuyen al desarrollo de aproximadamente el 25% de los cánceres humanos. Estas mutaciones alteran la estructura de las proteínas Ras de tal manera que se mantienen inde-

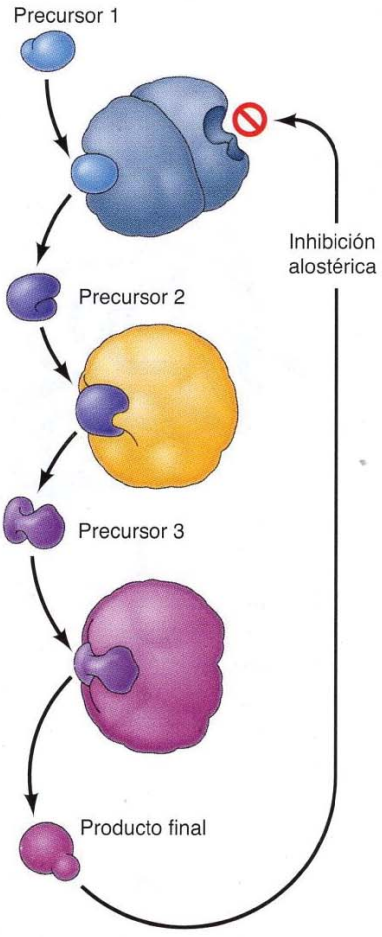


FIGURA 9.39 Inhibición *feedback*. El producto final de una ruta bioquímica actúa como un inhibidor alostérico de la enzima que cataliza la primera reacción de la ruta.

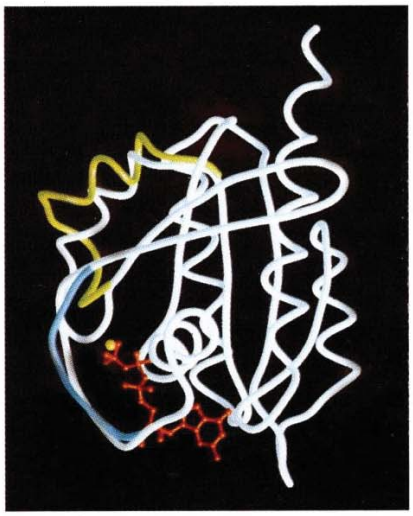


FIGURA 9.40 Diferencias conformacionales entre proteínas Ras activas e inactivas. Las proteínas Ras alternan entre una forma activa unida a GTP y una inactiva unida a GDP. El principal efecto de la unión a GTP frente a la unión a GDP es el cambio de conformación de dos regiones de la molécula, designadas regiones switch I y switch II. La parte de la proteína que forma complejo con GTP se representa en el dibujo en blanco, y la parte de unión al GDP de switch I y switch II se representan en azul y amarillo, respectivamente. El nucleótido de guanina se representa en rojo y el Mg^{+2} en amarillo. (Cortesía de Sung-Hou Kim, Universidad de California, Berkeley.)

finidamente en la conformación activa unida a GTP, actuando como una señal continua para la división celular, y de esta manera promueven un crecimiento incontrolado de las células tumorales. Por el contrario, las proteínas Ras normales (no mutadas) alternan entre las conformaciones de unión a GTP y de unión a GDP, de tal forma que sólo son activas bajo la influencia de ciertas hormonas o de factores de crecimiento que se encargan de controlar la proliferación celular en los organismos pluricelulares.

Fosforilación de proteínas y otras modificaciones

Los ejemplos expuestos en la sección anterior implican uniones no covalentes de las proteínas con pequeñas moléculas inhibidoras o activadoras. Como no se forman enlaces covalentes, la unión de estas moléculas reguladoras a la proteína es reversible, permitiendo que la célula responda rápidamente a los cambios ambientales. Sin embargo, la actividad de muchas proteínas también se regula por modificaciones covalentes. Un ejemplo de este tipo de regulación es la activación de algunas enzimas por escisión proteolítica de precursores inactivos. Ya se ha mencionado previamente en este capítulo que las enzimas digestivas y las proteínas que participan en la coagulación sanguínea y la muerte celular programada se regulan por este mecanismo. Sin embargo, puesto que la proteólisis es un proceso irreversible, es una vía de control de la actividad enzimática en vez de un mecanismo de activación y desactivación de las proteínas en respuesta a cambios ambientales. Por el contrario, otras modificaciones covalentes —en concreto la fosforilación— son procesos reversibles en el interior de la célula, y su función, al igual que la regulación alostérica, es activar o inhibir de manera reversible una gran variedad de proteínas celulares en respuesta a señales ambientales.

La fosforilación de proteínas está catalizada por enzimas **proteína quinasas o proteín quinasas**, la mayoría de las cuales transfieren un grupo fosfato desde el ATP a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina, treonina o tirosina (**Fig. 9.41**). Las proteínas quinasas son una de las familias de proteínas más grandes en eucariotas, constituyendo aproximadamente el 2% de los genes eucariotas. La mayoría de las proteína quinasas fosforilan la serina y la treonina o la tirosina: estas enzimas se llaman **serina/treonina quinasas** o **tirosina quinasas**, respectivamente. La fosforilación de las proteínas se revierte por las enzimas **proteína fosfatasas o proteín fosfatasas**, que catalizan la hidrólisis de un grupo fosfato de un aminoácido fosforilado. Como las proteína quinasas, la mayoría de las pro-

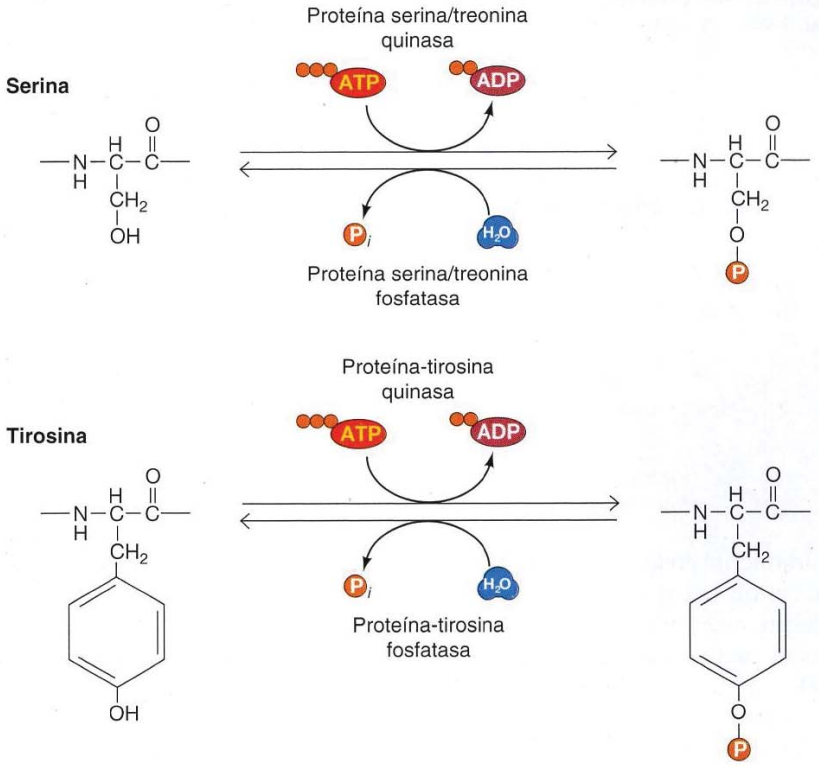


FIGURA 9.41 Proteína quinasas y fosfatasas. Las proteína quinasas catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a la cadena lateral de la serina y treonina (proteína serina/treonina quinasas) o de la tirosina (proteína-tirosina quinasas). Las proteína fosfatasas catalizan la eliminación mediante hidrólisis de los grupos fosfato de estos mismos aminoácidos.

teína fosfatasas son específicas de serina y treonina o de tirosina, aunque algunas proteína fosfatasas reconocen cualquiera de los tres fosfoaminoácidos.

La acción combinada de las quinasas y las fosfatasas media la fosforilación reversible de muchas proteínas celulares. Con frecuencia las proteína quinasas participan en vías de transducción de señales en las que una quinasa fosforila una segunda quinasa que puede actuar a su vez sobre otra quinasa. La acción secuencial de varias proteína quinasas puede transmitir una señal recibida en la superficie celular a una proteína diana en el interior de la célula, cuyo efecto final son cambios en el comportamiento celular en respuesta a estímulos ambientales.

El modelo de la acción de las proteína quinasas proviene de los estudios realizados por Ed Fischer y Ed Krebs en 1955 sobre el metabolismo del glucógeno. En las células musculares la hormona epinefrina (adrenalina) provoca la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato, proporcionando energía para la contracción muscular. La glucogenólisis está catalizada por la glucógeno fosforilasa, que está regulada por una proteína quinasa (**Fig. 9.42**). La epinefrina se une a su receptor en la superficie de la célula desencadenando la conversión de ATP en AMP cíclico (AMPc), el cual se une y activa a una proteína quinasa, llamada proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta quinasa fosforila y activa una segunda proteína quinasa denominada fosforilasa quinasa. La fosforilasa quinasa fosforila y activa la enzima glucógeno fosforilasa que conduce a la producción de glucosa. Estas fosforilaciones encadenadas que activan a la fosforilasa quinasa primero y a

EXPERIMENTO CLAVE

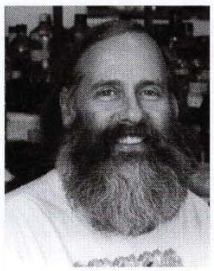
El descubrimiento de las tirosina-quinasas

Transforming Gene Product of Rous Sarcoma Virus Phosphorylates Tyrosine

Tony Hunter y Bartholomew M. Sefton

The Salk Institute, San Diego, CA

Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1980, Volumen 77, págs. 1311-1315



Tony Hunter

Bartholomew M. Sefton

Contexto

Tras su aislamiento en 1911, el virus del sarcoma de Rous (VSR) se convirtió en el primer virus conocido que producía tumores en animales (véase el recuadro de Medicina Molecular del Cap. 1). El VST se convirtió en un modelo atractivo de estudio del desarrollo tumoral debido a algunas de sus características. En particular, se creía que el pequeño tamaño del genoma del virus permitiría identificar genes víricos específicos implicados en la inducción de los procesos proliferativos anómalos que distinguen a las células tumorales. Este objetivo se hizo realidad en los años 70 cuando se determinó que la inducción del desarrollo tumoral requería un solo gen del VSR (denominado *src* por sarcoma). Cabe destacar la identificación de un gen *src* estrechamente relacionado con el anterior en el genoma normal de diversos vertebrados, como el ser humano. La proteína vírica Src dirige la proliferación incontrolada de las células tumorales, por lo que se supuso que la comprensión de su función aportaría datos muy importantes sobre el sustrato molecular de la inducción del cáncer y la regulación de la proliferación celular normal.

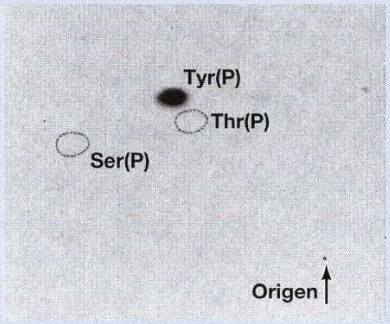
En 1977, Ray Erikson y cols. identificaron a la proteína Src a través de una técnica de inmunoprecipitación (véase Fig. 5.11) con antisuero de animales portadores de tumores inducidos por el VSR. Poco después, se descubrió que la incubación de los inmunoprecipitados de Src con ATP radioactivo se traducía en la fosforilación de las moléculas de inmunoglobulinas. Por consiguiente, Src parecía actuar como una proteína quinasa, de modo que la fosforilación de proteínas estaría implicada, sin lugar a dudas, en el control de la proliferación celular.

Todas las proteína quinasas descritas hasta ese momento llevaba a cabo reacciones de fosforilación de residuos de serina o treonina, los únicos fosfoaminoácidos identificados en las células animales. Sin embargo, Walter Eckhardt y Tony Hunter habían publicado en 1979 que la proteína oncogénica de otro virus tumoral animal (poliomavirus) se fosforilaba en un residuo de tirosina. Por ello, Hunter y Sefton investigaron la posible fosforilación de residuos de tirosina por acción de Src, en lugar de residuos de serina/treonina, en sus sustratos proteicos. A través de sus experimentos, estos autores lograron demostrar que Src funciona realmente como una proteína-tirosina quinasa, una actividad que actualmente se considera clave en las vías de señalización celular.

Experimentos

Hunter y Sefton identificaron el aminoácido fosforilado por Src mediante la incubación de inmunoprecipitados de Src con ATP marcado con ^{32}P. En esta prueba, el aminoácido fosforilado por Src en la proteína sustrato (en este caso, una inmunoglobulina) incorporaba el isótopo radioactivo. A continuación, se aislaba e hidrolizaba la inmunoglobulina para liberar las moléculas de aminoácido que se analizaban por métodos electroforéticos y cromatográficos para separar fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina (véase figura). El aminoácido radioactivo detectado en estos experimentos era fosfotirosina, lo que demostraba que Src llevaba a cabo una fosforilación específica de residuos de tirosina.

En otros experimentos se comprobó que la proteína Src de células normales, además de la de origen vírico, actuaba como proteína-tirosina quinasa en las pruebas de inmunoprecipitación. Además, Hunter y Sefton realizaron nuevos experimentos *in vitro* en los que demostraron la presencia de fosfotirosina en proteínas derivadas de células completas. En las células normales, la fosfotirosina tan solo representaba alrededor del 0,03% del conjunto total de fosfoaminoácidos (el resto correspondía a fosfoserina y fosfotreonina), lo que permite entender por qué no se había detectado anteriormente. Sin embargo, la fosfotirosina era unas 10 veces más abundante en las células infectadas por el VSR, lo que señalaba que la capacidad de inducción de la proliferación celular anómala del virus podía atribuirse al aumento de la actividad proteína-tirosina quinasa de la proteína vírica Src.



Identificación de fosfotirosina en inmunoglobulinas fosforiladas por Src. Se incubó un inmunoprecipitado que contenía Src del VSR con ATP marcado con ^{32}P. Se aislaron e hidrolizaron las inmunoglobulinas. Los aminoácidos presentes en el hidrolisado se separaron por electroforesis y cromatografía en una delgada placa de celulosa. Se determinaron las posiciones de los aminoácidos marcados con ^{32}P mediante la exposición de la placa a rayos X. Los círculos indican las posiciones de los aminoácidos no marcados que se incluyeron como marcadores. Obsérvese que el principal aminoácido marcado con ^{32}P es la fosfotirosina.

EXPERIMENTO CLAVE

Influencia

El descubrimiento de la actividad proteína-tirosina quinasa de Src supuso la identificación de una nueva actividad de proteína quinasa y la violación de esta actividad con el control de la proliferación celular. Tras la publicación de los hallazgos de Hunter y Sefton, se demostró que muchas otras proteínas de origen vírico funcionaban como proteína-tirosina quinasas, lo que permitió establecer una relación general entre la fosforilación de residuos de tirosina con la proliferación anómala de las células tumorales. Por otra parte, se han logrado identificar numerosas proteína-tirosina quinasas que intervienen en diversas vías de señalización en las células normales en un gran número de estudios realizados a raíz de estos descubrimientos. En algunos trabajos centrados en el mecanismo a través del cual un virus produce cáncer en el pollo se identificó una actividad enzimática hasta entonces desconocida que desempeña una función clave en las vías de señalización que controlan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las células. Por otra parte, como se comenta en el Capítulo 19, las proteína-tirosina quinasas codificadas por oncogenes se han convertido en las dianas más prometedoras hasta ahora para el desarrollo de fármacos específicos que actuarían frente a las células tumorales.

la glucógeno fosforilasa después, pueden ser revertidas por enzimas fosfatasas específicas, de tal manera que la eliminación del estímulo inicial (epinefrina) inhibe la degradación del glucógeno.

La vía de señalización que provoca la activación de la glucógeno fosforilasa se comienza por regulación alostérica debida a la unión de moléculas pequeñas a sus dianas —la epinefrina se une a su receptor y el AMPc se une a la proteína quinasa dependiente de AMPc—. La señal entonces se transmite a las dianas intracelulares mediante la acción secuencial de las proteína quinasas. Rutas similares, en las que participan enzimas quinasas y fosfatasas, están implicadas en la regulación de casi todos los aspectos del comportamiento en las células eucariotas (véanse Caps. 16 y 17). Las alteraciones de estas vías, relacionadas con alteraciones de tirosina quinasas, también son responsables de muchas enfermedades asociadas con una regulación inadecuada del crecimiento y diferenciación celular, en particular con el desarrollo del cáncer. En efecto, la primera proteína-tirosina quinasa se descubrió en 1980 en trabajos sobre proteínas oncogénicas de virus tumorales animales —en concreto, el virus del sarcoma de Rous— por Tony Hunter y Bartholomew Sefton. En otros estudios posteriores se vincularon diversas anomalías en las proteína-tirosina quinasas con el desarrollo de muchos tipos de cáncer en el ser humano y algunas pequeñas moléculas inhibidoras de estas enzimas representan algunos de los fármacos en desarrollo más prometedores frente al cáncer.

Pese a que la fosforilación es el tipo más frecuente y mejor estudiado de modificación covalente que regula la actividad proteica, otros tipos de modificaciones proteicas por pequeñas moléculas también juegan papeles importantes (**Fig. 9.43**). Estas son acetilación de residuos de lisina, metilación de lisina y arginina (descrita en el Capítulo 8 a propósito de las histonas), nitrosilación (adición de grupos NO) de residuos de cisteína, y glucosilación de serina y treonina. Estudios de proteómica recientes han demostrado que la acetilación de lisinas es una modificación especialmente frecuente que afecta a miles de proteínas en las células procariotas y eucariotas, incluidas muchas enzimas metabólicas además de proteínas reguladoras de la transcripción.

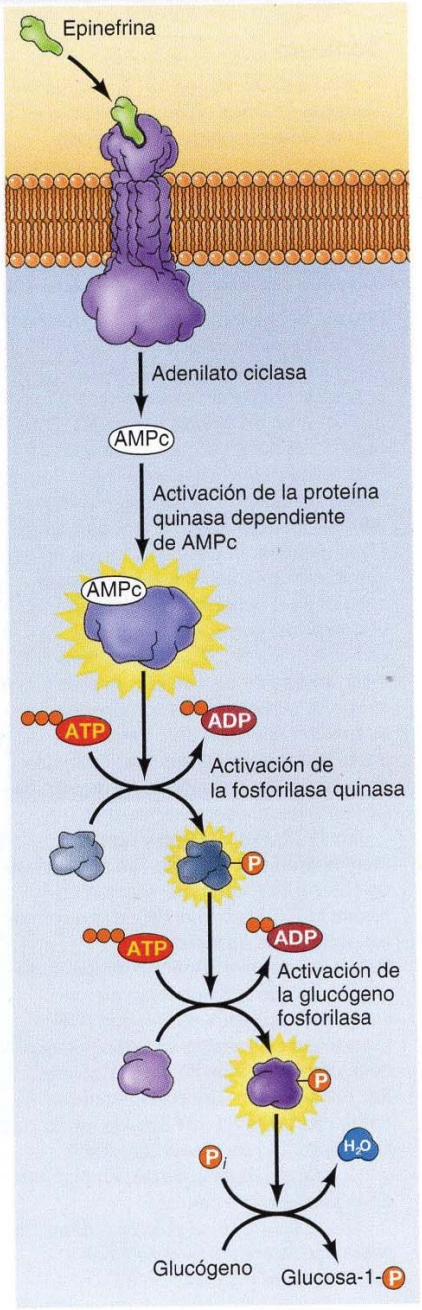


FIGURA 9.42 Regulación de la degradación del glucógeno por fosforilación de las proteínas. La unión de epinefrina (adrenalina) a receptores de la superficie celular provoca la producción de AMP cíclico (AMPc), que activa una proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta enzima fosforila y activa la fosforilasa quinasa que, a su vez, fosforila y activa la glucógeno fosforilasa. La glucógeno fosforilasa cataliza la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato.

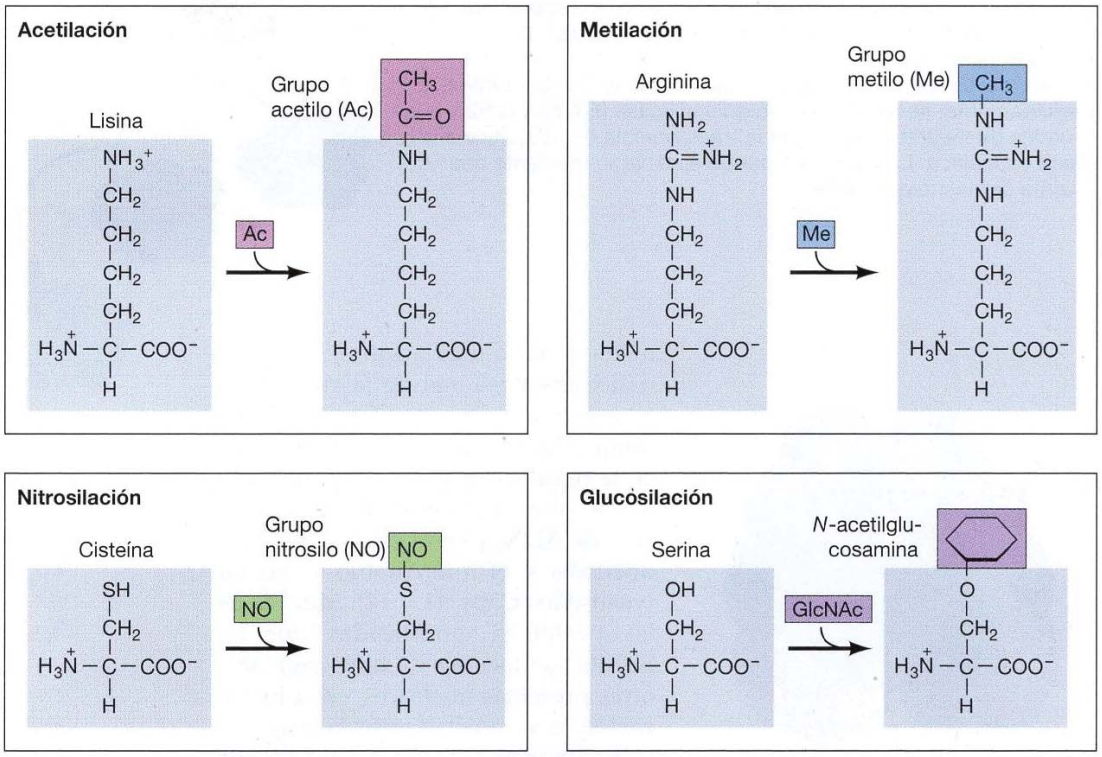


FIGURA 9.43 Modificación de las proteínas por moléculas de pequeño tamaño Además de la fosforilación, las proteínas pueden regularse por acetilación de residuos de lisina, metilación de lisina y residuos de la arginina, nitrosilación de residuos de cisteína y O-glucosilación (adición de *N*-acetilglucosamina) de serina (aquí mostrada) y residuos de treonina.

Además de la modificación por moléculas pequeñas, algunas proteínas son reguladas por la unión covalente de polipéptidos. El primer polipéptido para el que se descubrió este tipo de actuación fue la **ubiquitina**, un polipéptido de 76 aminoácidos que está altamente conservado en todos los eucariotas. En un principio se encontró que la ubiquitina se dirige a proteínas para degradación, tal como se expone en la siguiente sección de este capítulo. Sin embargo, hoy se reconoce que la modificación de proteínas por la adición de ubiquitina y otras proteínas similares, tales como **SUMO** (modificador relacionado con ubiquitina pequeño), actúa en varias funciones.

La ubiquitina está unida a los grupos amino de las cadenas laterales de residuos de lisina. La adición selectiva de ubiquitina a proteínas diana (ubiquitilación) es un proceso en varias etapas (**Fig. 9.44**). En primer lugar, la ubiquitina se activa mediante unión a una enzima activadora de ubiquitina, E1. A continuación, la ubiquitina se transfiere a una segunda enzima, denominada enzima de conjugación de ubiquitina (E2). Seguidamente, la ubiquitina se transfiere a la proteína diana por E2 en complejo con una tercera proteína, denominada ubiquitina ligasa o E3. Las E3 actúan como mediadoras en el reconocimiento selectivo de proteínas diana mediante la unión a un sustrato y a una E2. Las células de mamífero contienen sólo dos ubiquitinas E1, pero tienen aproximadamente 40 E2 y en torno 600 E3. De forma importante, la ubiquitina también puede eliminarse de proteínas diana mediante enzimas de desubiquitilación, con lo cual la ubiquitilación es una modificación proteínica reversible. Las SUMO y otras proteínas semejantes a ubiquitina se añaden y se eliminan de sus dianas mediante mecanismos similares.

La modificación de las proteínas ubiquitina y SUMO afecta a varias funciones. La modificación de las histonas por estos polipéptidos es un meca-

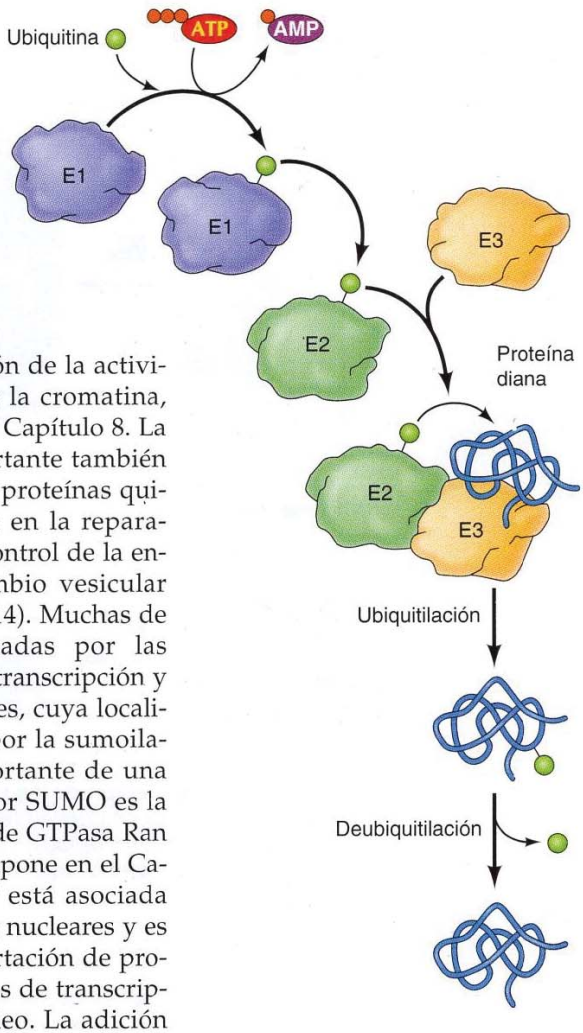


FIGURA 9.44 Modificación de proteínas por la ubiquitina. La ubiquitina es activada en primer lugar por la enzima E1. A continuación, la ubiquitina activada se transfiere a una de varias enzimas de conjugación de ubiquitina (E2) diferentes. Seguidamente, se asocia una ubiquitina ligasa (E3) con la E2 y una proteína de sustrato para dirigir la transferencia de ubiquitina a una diana específica. La ubiquitina puede eliminarse mediante una enzima de desubiquitilación.

nismo para la regulación de la actividad transcripcional de la cromatina, tal como se indica en el Capítulo 8. La ubiquitilación es importante también en la regulación de las proteínas quinasas, que intervienen en la reparación de ADN, y en el control de la endocitosis y el intercambio vesicular (véanse los Caps. 11 y 14). Muchas de las proteínas modificadas por las SUMO son factores de transcripción y otras proteínas nucleares, cuya localización se ve afectada por la sumoilación. Un ejemplo importante de una proteína modificada por SUMO es la proteína de activación de GTPasa Ran (Ran GAP). Como se expone en el Capítulo 10, la Ran GAP está asociada con complejos de poros nucleares y es necesaria para la importación de proteínas, como los factores de transcripción, del citosol al núcleo. La adición de SUMO a las Ran GAP es responsable de su asociación con el complejo de poros nucleares, y así de todo el intercambio de proteínas entre el citoplasma y el núcleo de las células eucariotas.

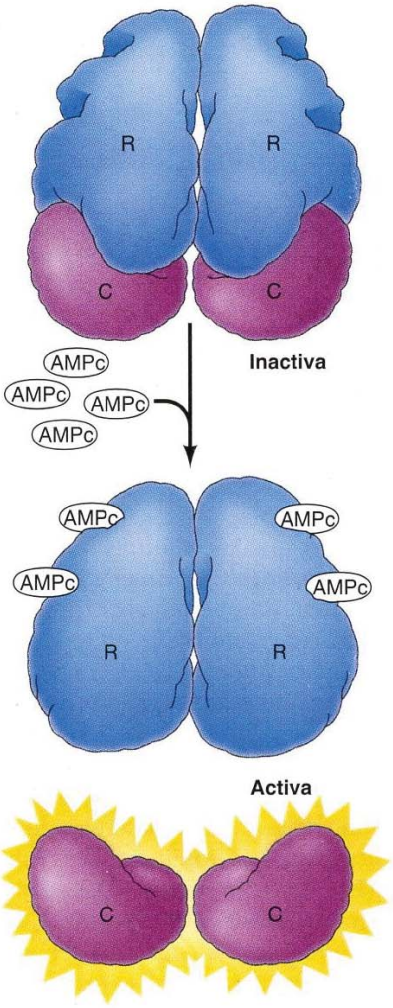


FIGURA 9.45 Regulación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. En el estado inactivo, la enzima consta de dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). El AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras e induce un cambio conformacional que provoca su disociación de las subunidades catalíticas, con lo que las subunidades catalíticas quedan enzimáticamente activas.

Interacciones proteína-proteína

Muchas proteínas están formadas por múltiples subunidades, cada una de las cuales es una cadena polipeptídica independiente. En algunas proteínas las subunidades son idénticas; en otras proteínas las subunidades son dos o más polipéptidos distintos. En cualquier caso la interacción entre los distintos polipéptidos es fundamental en la regulación de la actividad de la proteína. La importancia de estas interacciones es evidente en muchas enzimas alostéricas, como la aspartato transcarbamilasa, en la que la unión de una molécula reguladora altera la conformación de la proteína por cambios en las interacciones entre las subunidades.

Muchas enzimas también están reguladas por interacciones proteína-proteína. Un buen ejemplo es la proteína quinasa dependiente de AMPc, constituida por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas (**Fig. 9.45**). En esta conformación la proteína está inactiva; las subunidades reguladoras inhiben la actividad enzimática de las subunidades catalíticas. La enzima se activa por la unión del AMPc, el cual se une a las subunidades reguladoras provocando un cambio conformacional que conduce a la disociación del complejo; las subunidades catalíticas libres son proteína quinasas enzimáticamente activas. Por tanto el AMPc actúa como un regulador alostérico alte-

◆ La vía ubiquitina-proteasoma es responsable de la degradación de varias proteínas reguladoras importantes, incluyendo proteínas que controlan la proliferación celular y la supervivencia celular. Puesto que el crecimiento de las células cancerosas depende de la destrucción de estas proteínas reguladoras, el proteasoma se ha convertido en la diana de medicamentos anticancerosos. El Bortezomib fue el primer inhibidor del proteasoma aprobado para el tratamiento de un cáncer humano, el mieloma múltiple (véase Cap. 19).

rando las interacciones proteína-proteína. Como se estudia en capítulos sucesivos, otras interacciones proteína-proteína, que pueden en sí mismas estar reguladas mediante la unión de pequeñas moléculas y las modificaciones de proteínas (lo que incluye la fosforilación y la adición de ubiquitina y SUMO), juegan papeles críticos en el control de diversos aspectos del comportamiento celular.

Degradación de proteínas

La cantidad de proteínas en la célula está regulada no sólo por su tasa de síntesis sino también por su tasa de degradación. La vida media de las proteínas celulares es muy variable, desde pocos minutos a varios días, y las diferencias en la tasa de degradación de proteínas es un aspecto importante en la regulación celular. Muchas proteínas que son degradadas rápidamente actúan como moléculas reguladoras, como por ejemplo los factores de transcripción. El rápido reciclaje de estas proteínas es necesario para que sus niveles se ajusten rápidamente en respuesta a los estímulos externos. Otras proteínas se degradan en respuesta a señales específicas, siendo otro mecanismo de regulación de la actividad enzimática intracelular. Además, las proteínas defectuosas o dañadas son reconocidas y rápidamente degradadas en el interior de la célula, por lo que se eliminan las consecuencias de los errores producidos durante la síntesis de proteínas. En células eucariotas son dos las rutas principales que se encargan de la degradación de proteínas: la vía de la ubiquitina-proteasoma y la proteólisis lisosómica.

Vía de la ubiquitina-proteasoma

La ruta principal de la degradación selectiva de proteínas en células eucariotas usa la **ubiquitina** como un marcador de proteínas citosólicas y nucleares para una rápida proteólisis. Tal como se indicó antes, la ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos que puede fijarse a grupos amino mediante residuos de lisina y que regula las actividades de diversas proteínas diana. Las proteínas pueden ser objetivos de degradación por medio de la adición de múltiples ubiquitinas con el fin de formar una cadena de las mismas, que es catalizada por algunas E3 (**Fig. 9.46**). Estas proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y degradadas por un gran complejo con múltiples subunidades y con actividad proteasa llamado **proteasoma**.

Un gran número de proteínas que controlan procesos celulares fundamentales, como la expresión génica y la proliferación celular, son dianas para los procesos de ubiquitilación y proteólisis. Un ejemplo interesante de esta degradación controlada lo proporcionan las proteínas (conocidas como ciclinas) que regulan la progresión a través del ciclo celular de las células eucariotas (**Fig. 9.47**). La entrada en mitosis de las células eucariotas está controlada en parte por la ciclina B, que es una subunidad reguladora de una proteína quinasa llamada Cdk1 (véase Cap. 17). La asociación de la ciclina B con la enzima Cdk1 es necesaria para la activación de la quinasa Cdk1, que inicia los procesos que ocurren en la mitosis (incluyendo la condensación de los cromosomas y el desensamblaje de la envoltura nuclear) mediante la fosforilación de varias proteínas celulares. La Cdk1 también activa un sistema de proteólisis mediada por ubiquitina que degrada la ciclina B cerca del final de la mitosis. La degradación de la ciclina B inactiva a

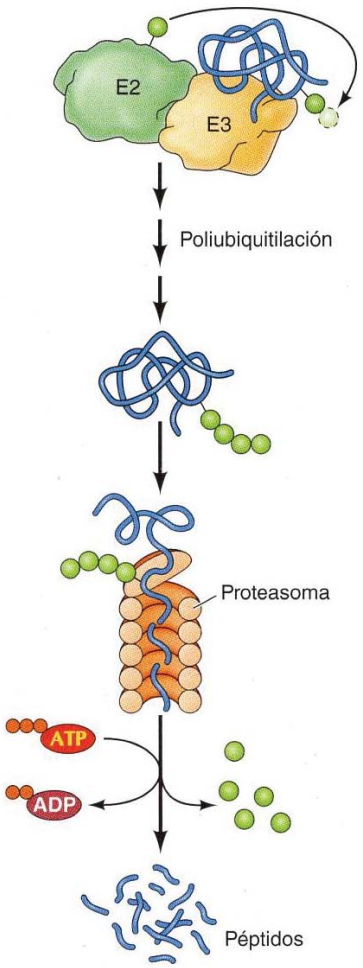


FIGURA 9.46 Vía de ubiquitina-proteasoma. Las proteínas son marcadas para su degradación rápida por la unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina para formar una cadena de ubiquitinas, mediada por algunas ligasas (E3). Las proteínas poliubiquitiladas son degradadas por un complejo de proteasas (el proteasoma).

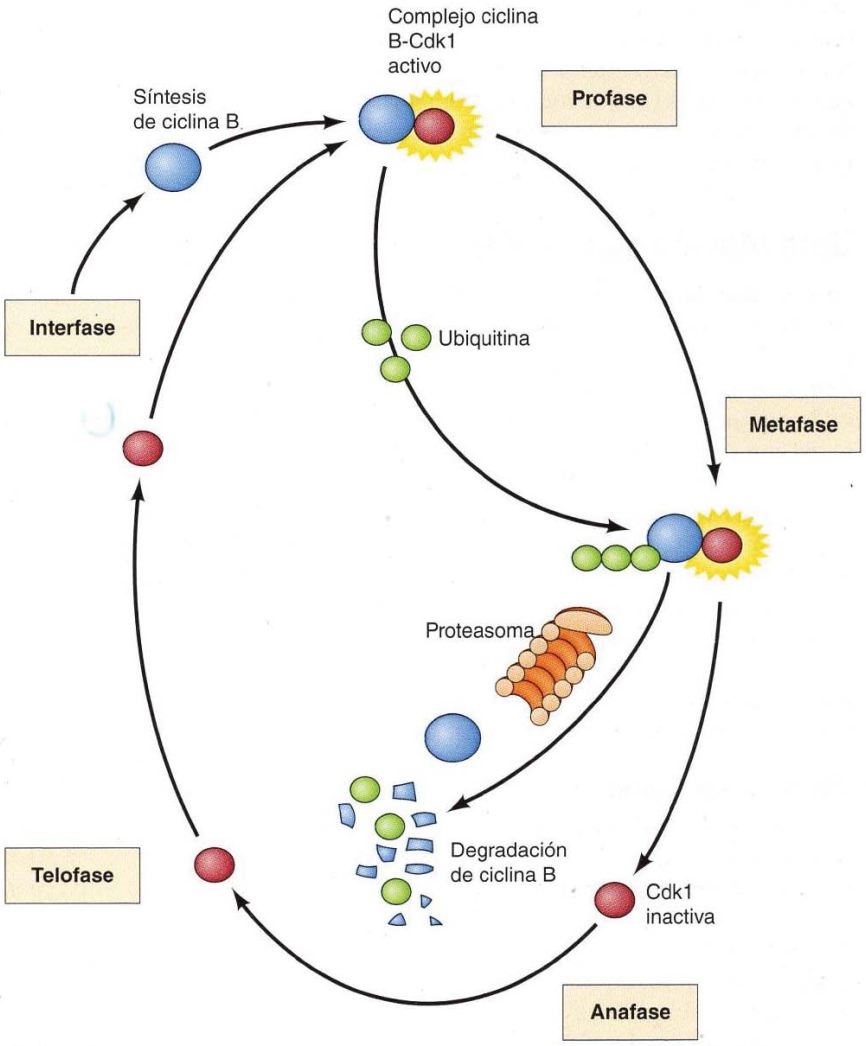


FIGURA 9.47 Degradación de la ciclina durante el ciclo celular. La progresión de las células eucariotas a través del ciclo celular es controlada en parte por la síntesis y degradación de la ciclina B, una subunidad reguladora de la proteína quinasa Cdk1. La síntesis de ciclina B durante la interfase lleva a la formación de un complejo activo ciclina B-Cdk1 que induce la entrada en mitosis. La degradación rápida de la ciclina B provoca la inactivación de la quinasa Cdk1, permitiendo que la célula salga de mitosis y entre en la interfase del siguiente ciclo celular.

ANIMACIÓN 9.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a9.2

Ruta de ubiquitina-proteasoma. La célula eucariótica marca mediante la ubiquitilación de las proteínas para su degradación rápida por acción de un complejo de proteasas.

Cdk1, permitiendo que la célula salga de la mitosis y entre en la interfase del siguiente ciclo celular. La ubiquitilación de la ciclina B es un proceso altamente selectivo, guiado por una secuencia de nueve aminoácidos en la ciclina B llamada caja de destrucción. Las mutaciones de esta secuencia impiden la proteólisis de la ciclina B, lo que provoca que la célula se detenga en la mitosis. De esta manera se demuestra la importancia de la degradación de proteínas en el control de los procesos de la división celular.

Proteólisis lisosómica

La otra ruta principal de degradación de proteínas en las células eucariotas supone la entrada de las proteínas a los **lisosomas**. Los lisosomas son orgánulos rodeados de membrana que contienen una serie de enzimas digestivas, incluyendo distintos tipos de proteasas (véase Cap. 11). Los lisosomas

tienen múltiples funciones en el metabolismo celular, incluyendo la digestión de proteínas extracelulares que entran en la célula por endocitosis, así como el reciclaje gradual de orgánulos citoplasmáticos y proteínas citosólicas.

El que las proteasas y otras enzimas digestivas estén contenidas en el interior de los lisosomas previene la destrucción incontrolada de los distintos componentes celulares. Por tanto, para que ocurra la proteólisis lisosómica, las proteínas de la célula primero deben entrar en los lisosomas. Un mecanismo de captura de las proteínas celulares, la **autofagia**, se produce mediante la formación de vesículas (autofagosomas) de tal manera que pequeñas áreas del citoplasma u orgánulos citoplasmáticos quedan rodeadas por membranas, muy probablemente procedentes del retículo endoplásmico (**Fig. 9.48**). Estas vesículas se fusionan con los lisosomas y las enzimas lisosómicas digestivas se encargan de digerir su contenido. La captura de la mayoría de las proteínas en los autofagosomas parece ser un proceso no selectivo, con lo cual ocasiona una degradación de proteínas citosólicas de vida larga. Este mecanismo degrada cerca del 1% de las proteínas celulares por hora. Además, algunos orgánulos, como las mitocondrias dañadas pueden ser marcados selectivamente para destruirse por autofagia, a menudo como consecuencia de su marcado mediante ubiquitilación.

La autofagia está regulada en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y durante el desarrollo de los organismos multicelulares. La autofagia generalmente se activa bajo condiciones de ausencia de nutrientes, permitiendo a las células degradar proteínas no esenciales y orgánulos para que puedan reutilizarse sus componentes. Además, la autofagia juega un papel importante en diversos procesos del desarrollo, como la metamorfosis de insectos, que implica una amplia remodelación de los tejidos y degradación de componentes celulares. Como se ha abordado en el Capítulo 18, la autofagia también desempeña un papel destacado en la muerte celular programada y las anomalías relacionadas con la autofagia se han vinculado con diversos trastornos en el ser humano, como enfermedades neurogenerativas y cáncer.

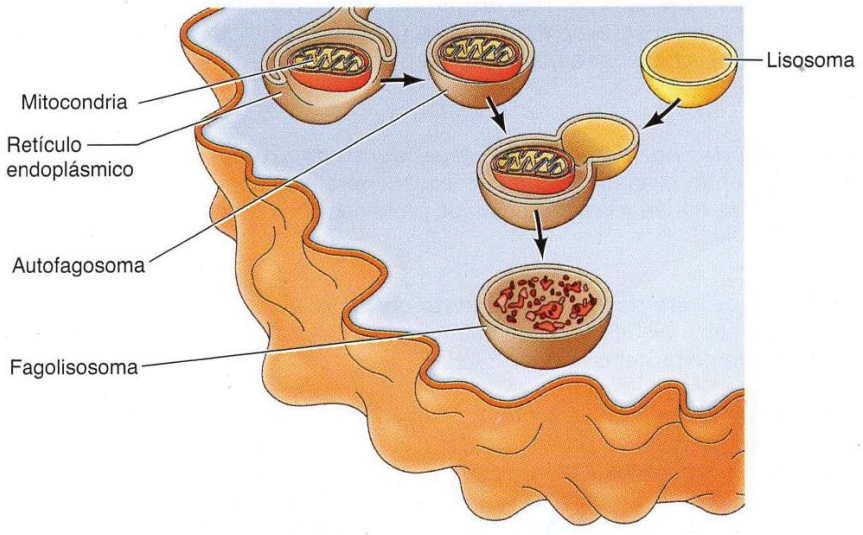


FIGURA 9.48 Autofagia. Los lisosomas contienen varios tipos de enzimas digestivas, incluyendo proteasas. Los lisosomas capturan las proteínas mediante la fusión de éstos con vesículas autofagosómicas. Éstas se forman al quedar envueltas zonas del citoplasma o distintos orgánulos en vesículas membranosas originadas en las membranas citosólicas. Esta fusión origina un fagolisosoma que digiere el contenido del autofagosoma.

RESUMEN

Traducción del ARNm

ARN de transferencia: Los ARN de transferencia sirven como adaptadores que alinean los aminoácidos en el molde de ARNm. Las aminoacil ARNt sintetasas unen los aminoácidos a los ARNt correspondientes, los cuales se unen a los codones del ARNm por complementariedad de bases.

ARN de transferencia, anticodón, aminoacil ARNt sintetasa

Ribosomas: Los ribosomas están formados por dos subunidades, compuestas de proteínas y ARN ribosómicos. El ARNr 23S es el catalizador de la formación del enlace peptídico.

ARNt

Organización de los ARNm e iniciación de la traducción: La traducción de los ARNm procariotas y eucariotas se inicia con un residuo de metionina. En bacterias, los codones de iniciación están precedidos por una secuencia que alinea el ARNm en los ribosomas con el ARN 16S por apareamiento de pares de bases. En eucariotas, los codones de inciación se identifican por el rastreo a partir del extremo 5' del ARNm, que es identificado porque tiene una caperuza («cap») de 7-metil guanosina.

región no traducida (UTR), policistrónico, monocistrónico, secuencia Shine-Dalgarno

Proceso de traducción: La traducción se inicia por la unión del metionil ARNt y el ARNm a la subunidad ribosómica pequeña. La subunidad ribosómica grande se une al complejo y la cadena polipeptídica crece hasta que el ribosoma encuentra un codón de terminación en el ARNm. Varios factores no ribosómicos son necesarios para los procesos de iniciación, elongación y terminación tanto en las células procariotas como eucariotas.

Ver Animación 9.1 y Vídeo 9.1

factor de iniciación, factor de elongación, factor de liberación, polisoma

Regulación de la traducción: La traducción de algunas moléculas específicas de ARNm se puede regular a través de la unión de proteínas represoras y por microARN no codificantes. De igual modo, la poliadenilación controlada del ARNm representa un mecanismo relevante en la regulación de la traducción en los estadios iniciales del desarrollo. Por otra parte, la actividad traduccional general de las células se puede controlar a través de la modificación de los factores de iniciación.

Interferencia de ARN (iARN) ARN de interferencia pequeño (ARNsi), microARN (ARNmi)

Plegamiento y procesamiento de proteínas

Chaperonas y plegamiento de proteínas: Las chaperonas moleculares facilitan el plegamiento proteico mediante su unión y estabilización de las cadenas polipeptídicas sin plegar o parcialmente plegadas.

Vídeo 9.2

chaperona

Enfermedades por defectos de plegamiento de proteínas: Diversas enfermedades, entre ellas afecciones neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, se deben a la agregación de proteínas con defectos de plegamiento.

Vídeo 9.3

enfermedad por defectos de plegamiento de proteínas, amiloide, prion

Enzimas que catalizan el plegamiento proteico: Al menos dos tipos de enzimas, la proteína disulfuro isomerasa y la peptidil prolil isomerasa, catalizan el plegamiento de proteínas.

proteína disulfuro isomerasa (PDI), preptidil prolil isomerasa

Escisión de proteínas: La proteólisis es un mecanismo importante en el procesamiento de muchas proteínas. Por ejemplo, las proteínas secretadas y las proteínas incorporadas a la mayoría de los orgánulos son marcadas para dirigirse a sus destinos mediante secuencias amino terminales que son eliminadas por escisión de proteínas cuando las cadenas polipeptídicas pasan a través de la membrana.

proteólisis, secuencia señal, peptidasa de señal

Glicosilación: Muchas proteínas eucariotas, en particular las secretadas y las incorporadas a la membrana plasmática, son modificadas por la adición de carbohidratos en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi.

glicosilación, glicoproteína, dolicol fosfato

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Unión de lípidos: Con frecuencia, la unión de lípidos por enlaces covalentes marca y ancla las proteínas a la membrana plasmática.

Regulación de la función de las proteínas

Regulación por pequeñas moléculas: Muchas proteínas están reguladas por la unión de pequeñas moléculas, como aminoácidos y nucleótidos, que inducen cambios en la conformación y actividad de las proteínas.

Fosforilación de proteínas y otras modificaciones: La fosforilación reversible controla la actividad de una gran variedad de proteínas celulares, y es debida a la actividad de proteína quinasas y fosfatasas. Las proteínas son reguladas también por la unión de otras moléculas pequeñas y polipéptidos.

Interacciones proteína-proteína: Las interacciones entre las cadenas polipeptídicas son importantes en la regulación de las enzimas alostéricas y de otras proteínas celulares.

Degradación de proteínas

Ruta de la ubiquitina-proteasoma: El principal mecanismo selectivo de degradación de proteínas en las células eucariotas utiliza la cadena de poliubiquitina como un marcador que etiqueta las proteínas para una rápida proteólisis por el proteasoma.

Ver Animación 9.2

Proteólisis lisosómica: Las proteasas lisosómicas degradan las proteínas extracelulares captadas mediante endocitosis y son las responsables de la lenta degradación de orgánulos citoplasmáticos y de proteínas citosólicas mediante autofagia. Algunas proteínas son marcadas para su degradación y desempeñan una función destacada en el desarrollo celular y la muerte celular programada.

PALABRAS CLAVE

N-miristoilación, prenilación, palmitoilación, glicolípido, glicosilfosfatidilinositol (GPI)

regulación alostérica

proteína quinasa, serina/treonina quinasa, tirosina quinasa, proteína fosfatasa, ubiquitina, SUMO

proteasoma

lisosoma, autofagia

Preguntas

1. *E. coli* contiene 64 codones diferentes en sus ARNm, 61 de los cuales codifican aminoácidos. ¿Cómo pueden sintetizar proteínas si sólo poseen 40 ARNt diferentes?
2. Desea expresar un ADNc (ADN complementario) eucariótico clonado en bacterias. ¿Qué tipo de secuencia debe añadir para que ese ARNm sea traducido por los ribosomas procariotas?
3. Discute las evidencias de que el ARN ribosómico es el principal componente catalítico del ribosoma.
4. ¿Qué efecto tendría un inhibidor de la poliadenilación sobre la síntesis proteica en óvulos fertilizados?
5. ¿Qué son las chaperonas? ¿Por qué es beneficioso para la síntesis de las proteínas de choque térmico ser inducidas mediante la exposición de las células a temperaturas elevadas?
6. Estás interesado en el estudio de una proteína expresada en la superficie de los hepatocitos. ¿Cómo podrías determinar, tratando estas células con una fosfolipasa, si estas proteínas son transmembrana o si están unidas a la superficie celular mediante el GPI?
7. ¿Cuál es la evidencia de que la ubiquitilación y degradación de proteínas específicas por proteosomas requiere una secuencia diana específica en la proteína?
8. ¿La ubiquitilación de una proteína siempre señaliza su destrucción por parte del proteosoma?

9. ¿Cómo regulan los ARNmi la traducción de ARNm específicos?
10. ¿Cuál es la función de las regiones no traducidas del extremo 3′ en los ARNm?
11. ¿Por qué es importante la escisión proteolítica regulada para la actividad de determinadas proteínas?
12. ¿Cómo asegura el ribosoma que se inserta el aminoacil ARNt correcto en el codón opuesto?
13. Estás estudiando la vía responsable de la secreción de ribonucleasa (ARNasa) en células pancreáticas en cultivo, estudiando la actividad de la ARNasa secretada al medio de cultivo. ¿Cómo afectaría la expresión de ARNsi dirigido frente a la proteína disulfuro isomerasa (PDI), a la cantidad de ARNasa activa que detectas en tus experimentos?

Bibliografía

Traducción del ARNm

Aitken, C. E. and J. R. Lorsch. 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Struc. Mol. Biol.* 19: 568–576. [R]

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920. [P]

Bartel, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233. [R]

Ben-Shem, A., L. Jenner, G. Yusupova and M. Yusupov. 2010. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330: 1203–1209. [P]

Beringer, M. and M. V. Rodnina. 2007. The ribosomal peptidyl transferase. *Mol. Cell* 26: 311–321. [R]

Buxbaum, A. R., G. Haimovich and R. H. Singer. 2015. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 95–109. [R]

Crick, F. H. C. 1966. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19: 548–555. [P]

Fabian, M. R. and N. Sonenberg. 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Struc. Mol. Biol.* 19: 586–593. [R]

Gebauer, F. and M. W. Hentze. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 827–835. [R]

Holcik, M. and N. Sonenberg. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Cell Mol. Biol.* 6: 318–327. [R]

Holt, C. E. and S. L. Bullock. 2009. Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326: 1212–1216. [R]

Ibba, M. and D. Soll. 2004. Aminoacyl-tRNAs: Setting the limits of the genetic code. *Genes Dev.* 18: 731–738. [R]

Jackson, R. J., C. U. T. Hellen and T. V. Pestova. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 113–127. [R]

Laursen, B. S., H. P. Sorensen, K. K. Mortensen and H. U. Sperling-Petersen. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 101–123. [R]

Martin, K. C. and A. Ephrussi. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136: 719–730. [R]

Nilsen, T. W. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 23: 243–249. [R]

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920–930. [P]

Noller, H. F., V. Hoffarth and L. Zimniak. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256: 1416–1419. [P]

Nomura, M. 1997. Reflections on the days of ribosome reconstitution research. *Trends Biochem. Sci.* 22: 275–279. [R]

Richter, J. D. 2007. CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* 32: 279–285. [R]

Richter, J. D. and N. Sonenberg. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433: 477–480. [R]

Sonenberg, N., and A. G. Hinnesbusch. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731–745. [R]

Spriggs, K. A., M. Bushell and A. E. Willis. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40: 228–237. [R]

Steitz, T. A. 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 242 – 253. [R]

Wu, L. and J. G. Belasco. 2008. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 29: 1–7. [R]

Plegamiento y procesamiento de proteínas

Bulleid, N. J. and L. Ellgaard. 2011. Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem. Sci.* 36: 485–492. [R]

Ellis, R. J. 2006. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem. Sci.* 31: 395–401. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein *N*-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276: 39501–39504. [R]

Hebert, D. N., S. C. Garman and M. Molinari. 2005. The glycan code of the endoplasmic reticulum: Asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol.* 15: 364–370. [R]

Helenius, A. and M. Aebi. 2004. Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 1019–1049. [R]

Horwich, A. L., W. A. Fenton, E. Chapman and G. W. Farr. 2007. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 115–145. [R]

Iyer, S. P. N. and G. W. Hart. 2003. Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: Enzymes of *O*-GlcNAc cycling. *Biochem.* 42: 2493–2499. [R]

Jonas, S. and E. Izaurralde. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Rev. Genet.* 16: 421–433. [R]

Knowles, T. P. J., M. Vendruscolo and C. M. Dobson. 2014. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 384–396. [R]

Mayer, M. P. 2010. Gymnastics of molecular chaperones. *Mol. Cell* 39: 321–331. [R]

Ohtsubo, K. and J. D. Marth. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855–867. [R]

Paetzel, M., A. Karla, N. C. Strynadka and R. E. Dalbey. 2002. Signal peptidases. *Chem. Rev.* 102: 4549–4580. [R]

Prusiner, S. B. 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13363–13383. [R]

Prusiner, S. B. 2013. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Ann. Rev. Genet.* 47: 601–623. [R]

Selkoe, D. J. 2011. Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a004457. [R]

Soto, C. 2012. Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell* 149: 968–977. [R]

Taipale, M., D. F. Jarosz and S. Lindquist. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 515–528. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563–591. [R]

Wilkinson, B. and H. F. Gilbert. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699: 35–44. [R]

Wright, L. P. and M. R. Philips. 2006. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* 47: 883–891. [R]

Yan, A. and W. J. Lennarz. 2005. Unraveling the mechanism of protein *N*-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 280: 3121–3124. [R]

Yebenes, H., P. Mesa, I. G. Munoz, G. Montoya and J. M. Valpuesta. 2011. Chaperonins: two rings for folding. *Trends Biochem. Sci.* 36: 424–432. [R]

Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers and F. U. Hartl. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 781–791. [R]

Regulación de la función de las proteínas

Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon and T. Mustelin. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699–711. [R]

Barford, D. 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 407–412. [R]

Chen, Z. J. and L. J. Sun. 2009. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol. Cell* 33: 275–286. [R]

Choudhary, C., B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin and M. Mann. 2014. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*15: 536–550. [R]

Fauman, E. B. and M. A. Saper. 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 413–417. [R]

Fischer, E. H. and E. G. Krebs. 1989. Commentary on "The phosphorylase to converting enzyme of rabbit skeletal muscle." *Biochim. Biophys. Acta* 1000: 297–301. [R]

Gareau, J. R. and C. D. Lima. 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 861–871. [R]

Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter. 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42–52. [R]

Hess, D. T., A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E. Marshall and J. S. Stamler. 2005. Protein *S*-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150–166. [R]

Hochstrasser, M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458: 422–429. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225–236. [R]

Huse, M. and J. Kuriyan. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275–282. [R]

Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27: 514–520. [R]

Marianayagam, N. J., M. Sunde and J. M. Matthews. 2004. The power of two: Protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.* 29: 618–625. [R]

Milburn, M. V., L. Tong, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura and S.-H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247: 939–945. [P]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306–329. [P]

Ulrich, H. D. and H. Walden. 2010. Ubiquitin signaling in DNA replication and repair. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 479–489. [R]

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294: 1299–1304. [R]

Degradación de proteínas

Bedford, L., S. Paine, P. W. Sheppard, R. J. Mayer and J. Roelofs. 2010. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol.* 20: 391–401. [R]

Boya, P., F. Reggiori and P. Codogno. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biol.* 15: 713–720. [R]

Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132–138. [P]

Kleiger, G. and T. Mayor. 2014. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol.* 24: 352–359. [R]

Mizushima, N. and B. Levine. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biol.* 12: 823–830. [R]

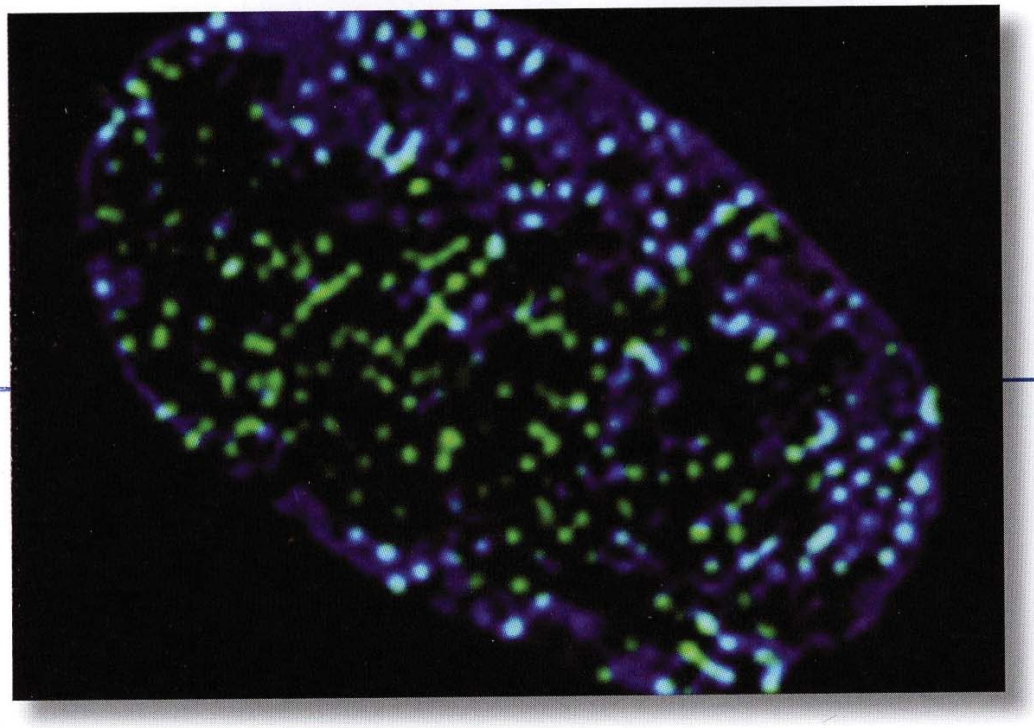
Mizushima, N. and M. Komatsu. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728–741. [R]

Pickart, C. M. and R. E. Cohen. 2004. Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 177–187. [R]

Reed, S. I. 2003. Ratchets and clocks: The cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 855–864. [R]

Parte III

Estructura y función celulares



Capítulo 10 **Núcleo**

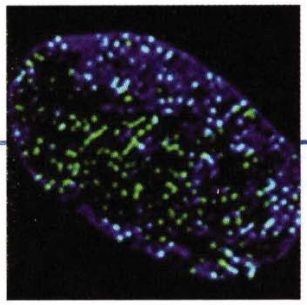
Capítulo 11 **Distribución y transporte de proteínas**

Capítulo 12 **Mitocondria, cloroplastos y peroxisomas**

Capítulo 13 **Citoesqueleto y movimiento celular**

Capítulo 14 **Membrana plasmática**

Capítulo 15 **Paredes celulares, matriz extracelular e interacciones celulares**



Capítulo 10

Núcleo

Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma 367

Organización de cromosomas 381

Cuerpos nucleares 386

MEDICINA MOLECULAR:
Enfermedades de la lámina nuclear 371

EXPERIMENTO CLAVE:
Identificación de las señales de localización nuclear 374

La existencia del núcleo es la característica principal que diferencia las células eucariotas de las células procariotas. Por contener el genoma celular, el núcleo sirve de almacén de la información genética y como centro de control celular. La replicación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARN ocurren en el interior del núcleo, y sólo la última etapa de la expresión génica (traducción) tiene lugar en el citoplasma.

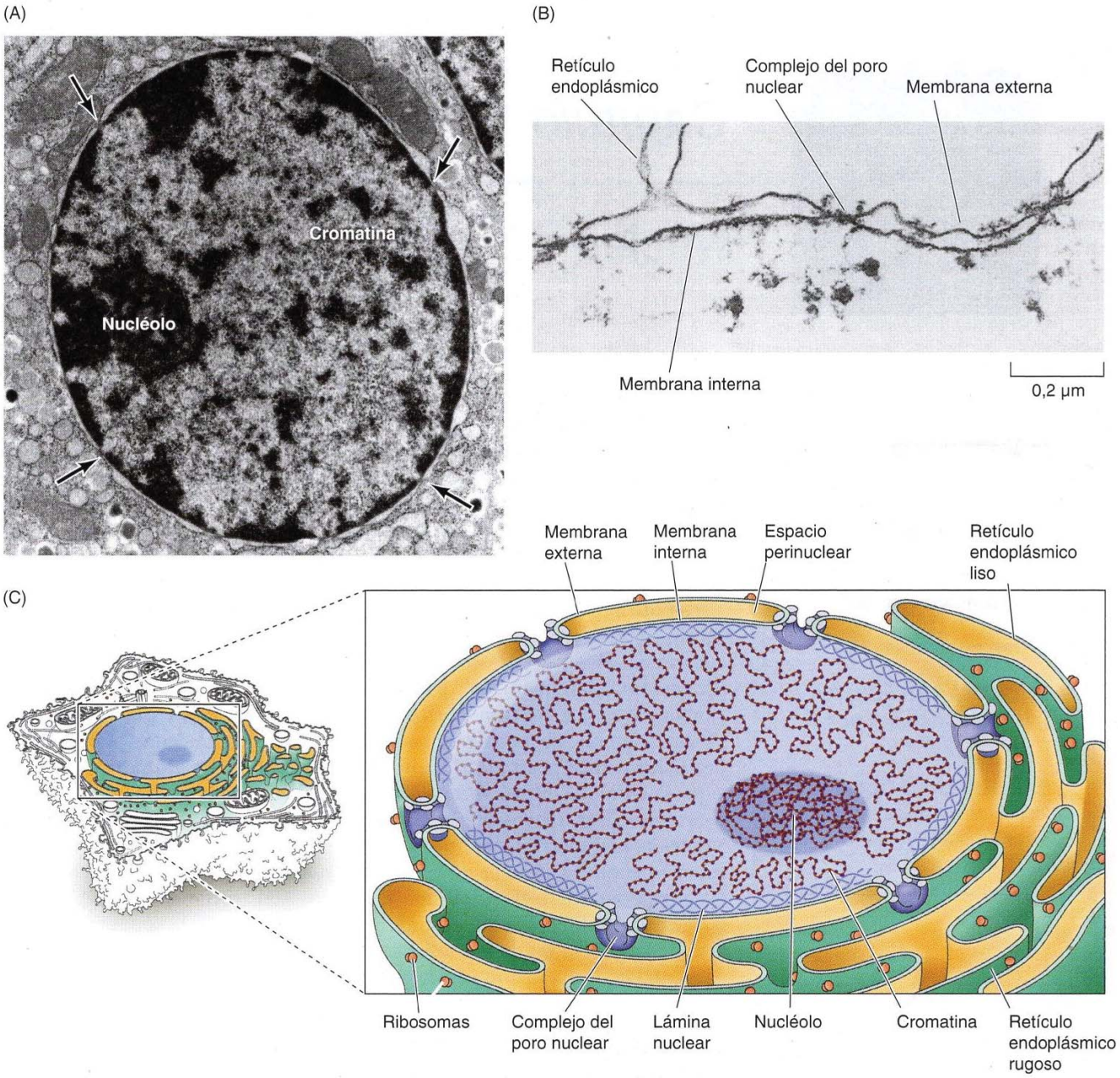
Debido a que la envuelta nuclear separa el genoma del citoplasma, la expresión génica está regulada por mecanismos exclusivos de los organismos eucariotas. Mientras que los ARNm procariotas son traducidos a la vez que ocurre la transcripción, los ARNm eucariotas sufren procesos postranscripcionales antes de ser transportados desde el núcleo al citoplasma. La presencia de un núcleo, por tanto, permite que la expresión génica sea regulada por mecanismos postranscripcionales, como el *splicing* alternativo. Debido a que la envuelta nuclear limita el acceso de las proteínas al material genético, proporciona nuevas posibilidades para el control de la expresión génica a nivel de la transcripción. Por ejemplo, la expresión de algunos genes eucariotas se controla a través de la regulación del transporte de los factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo —un mecanismo de regulación transcripcional inexistente en procariotas—. Por tanto, la separación entre el genoma y el lugar de la traducción del ARNm desempeña un papel fundamental en la expresión génica en las células eucariotas.

Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma

La envuelta nuclear separa el contenido del núcleo del citoplasma y proporciona un armazón estructural al núcleo. Las membranas nucleares actúan como una barrera selectiva que impide el libre paso de las moléculas entre el interior nuclear y el citoplasma, manteniéndolos como dos compartimentos metabólicamente independientes. Los únicos canales en la envuelta nuclear están representados por los complejos de poro nucleares, que permiten un intercambio controlado de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. El tráfico selectivo de proteínas y ARN a través de los complejos de poro nucleares no sólo mantiene la composición interna del núcleo sino que tiene un papel clave en la regulación de la expresión génica.

Estructura de la envuelta nuclear

La **envuelta nuclear** posee una estructura compleja, constituida por dos membranas nucleares, la lámina nuclear en su cara interna y por los com-



plejos de poro nucleares (**Fig. 10.1**). El núcleo está delimitado por un sistema de dos membranas concéntricas, las **membranas nucleares** interna y externa. La membrana nuclear externa se continúa con la membrana del retículo endoplásmico, por lo que hay una comunicación directa entre el espacio intermembrana y el lumen del retículo endoplásmico. Además, la membrana nuclear externa es funcionalmente similar a la del retículo endoplásmico (véase Cap. 11) y también posee ribosomas adheridos a su superficie citoplasmática, si bien su composición proteica es ligeramente diferente, ya que es rica en proteínas de membrana que se unen al citoesqueleto y carece de las proteínas que mantienen la organización cilíndrica del retículo endoplasmático. Por el contrario, la membrana nuclear interna contiene aproximadamente 60 proteínas de membrana integral específicas, como aquellas que unen la matriz nuclear de láminas (estudiada más adelante).

FIGURA 10.1 Envuelta nuclear. (A) Micrografía electrónica de un núcleo. Las membranas nucleares interna y externa se unen en los complejos del poro nuclear *(flechas)*. (B) La micrografía electrónica muestra la continuidad de la membrana nuclear externa con el retículo endoplásmico. (C) Esquema de la envuelta nuclear. La membrana nuclear interna está en contacto con la lámina nuclear, que sirve de anclaje para la cromatina. (B, cortesía del Dr. Werner W. Franke, German Cancer Research Center, Heidelberg.)

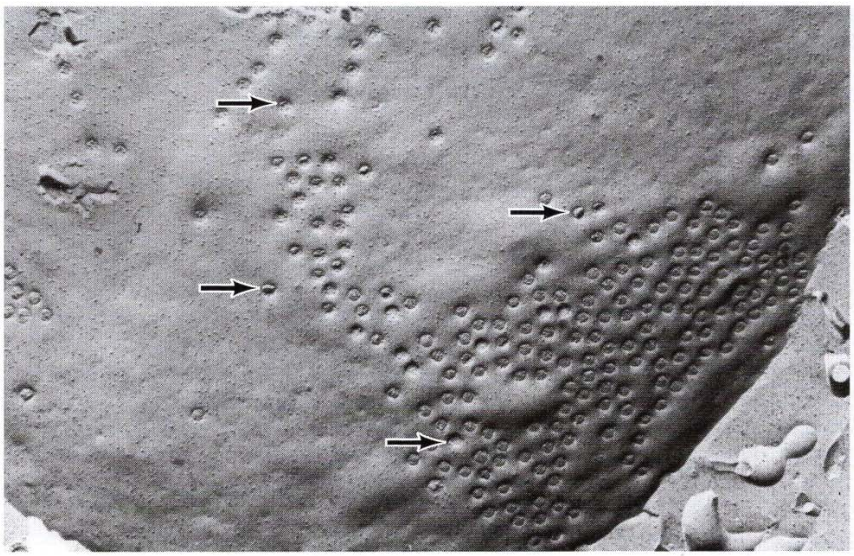


FIGURA 10.2 Micrografía electrónica que muestra los poros nucleares. Se observan muchos poros nucleares *(flechas)* en esta preparación por criofractura de la envuelta nuclear.

◆ Los eritrocitos (glóbulos rojos) en mamíferos carecen de núcleo. A medida que se desarrollan a partir de células precursoras, el núcleo se extruye del eritrocito (Cap. 18).

La función principal de las membranas nucleares es actuar como una barrera que separa el contenido del interior nuclear del citoplasma. Como otras membranas celulares, la membrana nuclear es una bicapa fosfolipídica, permeable sólo a pequeñas moléculas apolares (véase Fig. 2.36). Otras moléculas son incapaces de difundir a través de esta bicapa fosfolipídica. Las membranas interna y externa se unen en los complejos de poro nuclear, siendo los únicos canales que permiten el paso de pequeñas moléculas polares y de macromoléculas a través de la envuelta nuclear (**Fig. 10.2**). Como se estudiará en la sección siguiente, el complejo del poro nuclear es una estructura compleja responsable del tráfico selectivo de proteínas y de ARN entre el núcleo y el citoplasma.

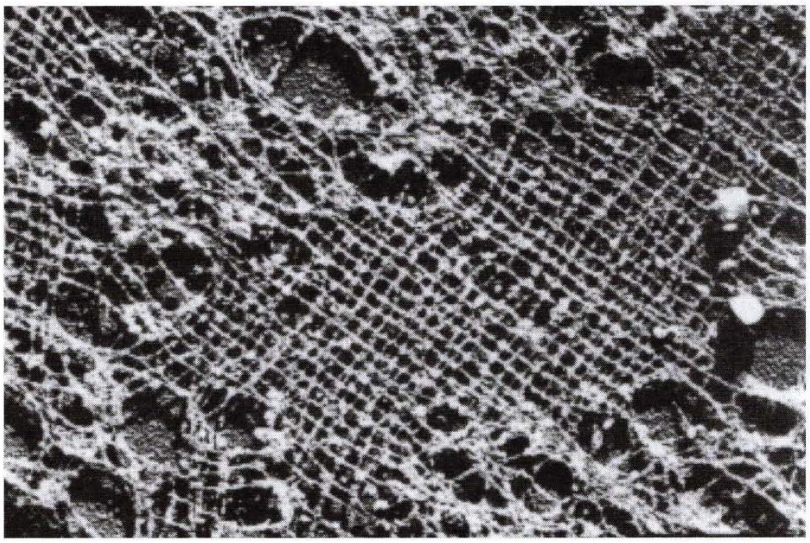
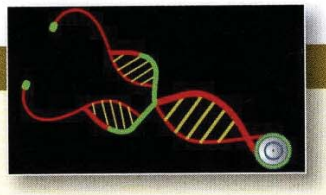


FIGURA 10.3 Micrografía electrónica de la lámina nuclear. La lámina de los oocitos de *Xenopus* es una malla de filamentos subyacente a la membrana nuclear interna que se extiende al interior del núcleo. (Tomado de U. Aebi y cols., 1986. *Nature* 323: 560.)

Subyacente a la membrana nuclear interna se localiza la **lámina nuclear**, una red fibrosa que proporciona soporte estructural al núcleo. La lámina nuclear de los oocitos de *Xenopus* tiene el aspecto de una malla diferenciada de fibras perpendiculares (**Fig. 10.3**), aunque no está claro si la lámina de las células somáticas posee una estructura similar. La lámina nuclear está compuesta de proteínas fibrosas de 60 a 80 kilodalton (kd) denominadas **laminas** junto a algunas proteínas asociadas. Las células vegetales poseen una red fibrosa similar integrada por proteínas no relacionadas. Las lamininas son un tipo de proteínas de los filamentos intermedios; las otras clases se encuentran en el cictoesqueleto (véase Cap. 13). Al igual que las otras proteínas de los filamentos intermedios, las láminas se ensamblan entre ellas para formar filamentos (**Fig. 10.4**). El primer nivel de asociación es la interacción



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedades de la lámina nuclear

Enfermedades

En 1966, Alan Emery y Fritz E. Dreifuss describieron una nueva distrofia muscular ligada al cromosoma X. En estadios tempranos de la enfermedad, los codos, cuello y talones de los individuos afectados se vuelven rígidos, y a menudo se produce un bloqueo de la conducción en el corazón. Estos síntomas aparecen antes de los 10 años de edad e incluyen «andar de puntillas» debido a rigidez de los tendones de Aquiles, y dificultad para doblar los codos. A los 20 años de edad han aparecido problemas cardíacos y puede ser necesario un marcapasos. Se produce una debilidad y degeneración gradual de los músculos del hombro y brazo superior y de los músculos de la pantorrilla, pero esto tiene lugar lentamente y a menudo no supone un problema hasta tarde en la vida.

Casi 30 años más tarde, los investigadores demostraron que mutaciones en una nueva proteína transmembrana eran responsables de esta distrofia muscular ligada al cromosoma X de Emery-Dreifuss. Denominaron a la proteína emerina, en honor a Alan Emery. Poco después, varios grupos encontraron que la emerina era una proteína localizada en la membrana nuclear interna y ausente en pacientes con la distrofia muscular ligada al cromosoma X de Emery-Dreifuss. Esto era inesperado; las mutaciones en una proteína de la envuelta nuclear expresada en todas las células, aparentemente causaba una enfermedad específica de tejido. Mientras que todas las células del cuerpo carecían de la proteína, la patología sólo se producía en el músculo. Investigadores posteriores encontraron que la misma distrofia también podía heredarse de una forma no ligada al sexo. Familias con esta distrofia muscular de Emery-Dreifuss no ligada al sexo, poseían mutaciones en *LMNA*, el gen único que codifica las láminas A y C. Así, mutaciones en dos genes, uno que codifica una proteína de la membrana nuclear interna y otro que codifica una de las principales láminas nucleares, causaban una distrofia muscular clínicamente idéntica.

Más sorprendente fue que investigaciones paralelas sobre distintas enfermedades, la lipodistrofia parcial de tipo Dunnigan y el trastorno de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2B1, las situó en distintas mutaciones del gen *LMNA*. Anteriormente, los médicos clasificaban a estas enfermedades como distintas basándose en sus características clínicas y en su herencia. Trabajos recientes demuestran que las mutaciones de otra proteína de la membrana nuclear interna, el receptor para la lámina B, son la base para la Anomalía de Pelger-Huët.

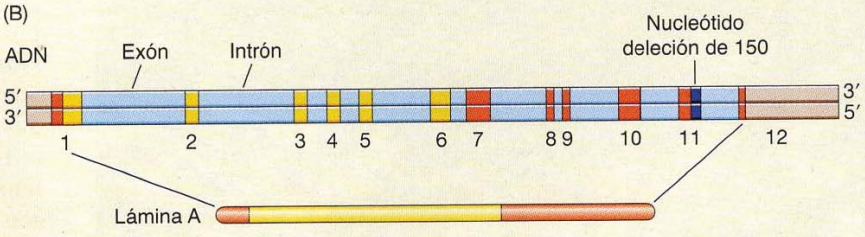
Bases moleculares y celulares

La mayoría de los biólogos creían que las mutaciones en las láminas causarían defectos generalizados sobre la arquitectura nuclear y serios problemas en células que se dividen rápidamente. Sin embargo, sólo se producen aberraciones menores de la estructura nuclear en estos pacientes. Así, el misterio es cómo mutaciones en las láminas nucleares o proteínas de unión a las láminas, causan diferentes enfermedades tejido- específicas. La respuesta todavía no se conoce pero existen dos hipótesis principales. La primera es la hipótesis de la «expresión génica». Esta defiende que la correcta interacción entre las dos proteínas láminas A y C, con la envuelta nuclear es esencial para la expresión normal y específica de tejido de ciertos genes. Los genes transcripcionalmente inactivos se localizan preferentemente en la periferia nuclear, mientras que los genes expresados se concentran en el centro del núcleo con una especificidad dependiente del tipo celular. Así, la base de estas enfermedades sería un cambio en la expresión génica causada por interacciones proteicas defectuosas.

En la hipótesis del «estrés mecánico», se cree que las mutaciones en el complejo láminas-emerina debilitan la integridad estructural de una red citoesquelética integrada. En todas las células, la lámina, la membrana nuclear interna y el complejo del poro nuclear están estrechamente relacionados. Esta hipótesis, que funciona mejor para las distrofias musculares, sugiere que a través de filamentos adheridos al complejo del poro nuclear, la lámina podría conectarse indirectamente con el citoesqueleto de la célula muscular.

(A)

(B)



(A) Un niño con progeria de Hutchinson-Gilford. (B) Diagrama de la estructura intrón-exón del gen *LMNA* y la proteína laminina A, con los dominios globulares indicados en rojo y los dominios en forma de bastón en amarillo. El ARNm codificado por el gen mutante mostrado tiene una deleción de 150 pares de bases (azul oscuro) en el exón 11 debidas a un corte y empalme aberrante. (A, por cortesía de Maggie Bartlett, National Human Genome Research Institute.)

MEDICINA MOLECULAR

Prevención y tratamiento

El descubrimiento de que las mutaciones en proteínas frecuentemente expresadas del complejo de la lámina nuclear causan diferentes enfermedades hereditarias específicas de tejido, ha sido una sorpresa y ha modificado la forma en que los científicos consideran a la envuelta nuclear. Se requiere más investigación para conocer si la base de las patologías de cada una de estas enfermedades es la regulación mecánica o la expresión génica. Sin embargo, la naturaleza molecular conocida de las enfermedades simplifica enormemente su diagnóstico y hace que su tratamiento sea más probable. El desarrollo reciente de un modelo de ratón en el que el gen *LMNA* está anulado representa un primer paso. A medida que se desarrollan los embriones, muestran síntomas de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Finalmente, los investigadores son actualmente conscientes de que varias enfermedades congénitas de desarrollo lento pueden ser nuevos miembros de las «laminopatías» nucleares.

Referencias

Davidson, P. M. and J. Lammerding. 2014. Broken nuclei—lamins, nuclear mechanics and disease. *Trends Cell Biol.* 24: 247–256.

entre dos láminas para formar un dímero en el que las zonas α-hélice de dos polipéptidos están enrolladas una alrededor de otra en una estructura llamada «bobina o espiral enrollada» (*coiled coil*). Los dímeros se asocian entre sí dando lugar a los filamentos que constituyen la lámina nuclear.

La asociación entre las láminas y la membrana nuclear interna está facilitada por la adición postraduccional de lípidos —en particular, la prenilación de los residuos de cisteína carboxilo terminales (véase Fig. 9.36)—. Además, las láminas interaccionan con proteínas de la membrana nuclear interna, como la emerina y el receptor de laminina B, mediando su unión a la envuelta nuclear y localizando y organizándolas en el interior nuclear (**Fig. 10.5**). La lámina nuclear está relacionada también con la cromatina a través de interacciones asociadas con la cromatina, con la emerina y con el receptor de laminina B. Como se verá más adelante en este capítulo, la interacción de la cromatina con la envuelta nuclear desempeña un papel importante en la localización de heterocromatina no transcrita en la periferia del núcleo.

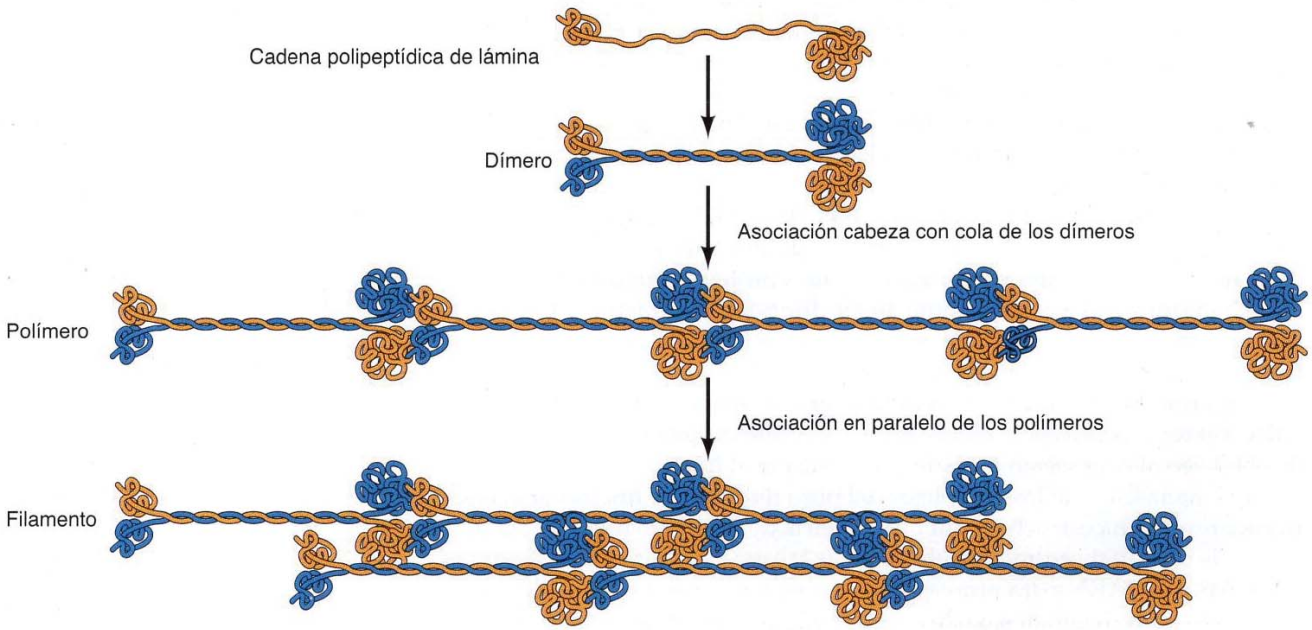


FIGURA 10.4 Ensamblaje de las láminas. Las láminas forman dímeros en los que las regiones centrales en α-hélice de dos cadenas polipeptídicas se enrollan una sobre otra. Un nivel superior de ensamblaje es la asociación cabeza con cola de los dímeros para formar polímeros lineales y la asociación en paralelo de éstos para constituir filamentos.

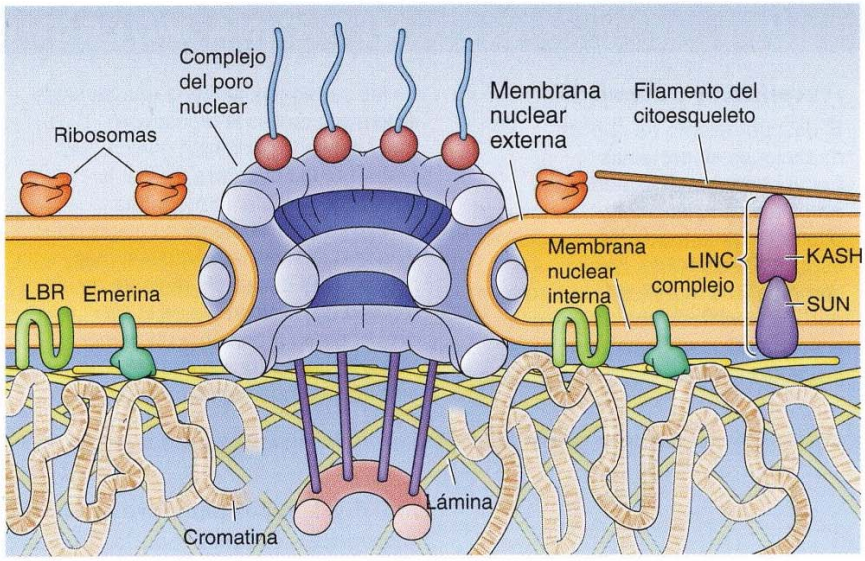


FIGURA 10.5 La lámina nuclear. La membrana nuclear interna contiene varias proteínas integrales, como la emerina, el receptor de laminina B (LBR) y las proteínas SUN, que interaccionan con las láminas nucleares. Las proteínas SUN se unen a las proteínas KASH en la envuelta nuclear externa, creando el complejo LINC que conecta la lámina nuclear con el citoesqueleto. Las láminas y las proteínas de la membrana nuclear interna también interaccionan con la cromatina a través de interacciones de emerina y del receptor de laminina B con proteínas asociadas a la cromatina.

Complejo del poro nuclear

Los **complejos del poro nuclear** son los únicos canales a través de los cuales pueden viajar pequeñas moléculas polares, iones y macromoléculas (proteínas y ARN) entre el núcleo y el citoplasma. El complejo del poro nuclear es una estructura muy grande con un diámetro de aproximadamente 120 nm y un peso molecular estimado de aproximadamente 125 millones de daltons —unas 30 veces el tamaño de un ribosoma—. En los vertebrados, el complejo del poro nuclear está compuesto por múltiples copias de aproximadamente 30 proteínas distintas (llamadas nucleoporinas). Mediante el control del tráfico de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, el complejo del poro nuclear tiene un papel fundamental en la fisiología de todas las células eucariotas. Las moléculas de ARN que son sintetizadas en el núcleo deben ser exportadas de manera eficiente al citoplasma, donde intervienen en la síntesis de proteínas. Por otro lado, las proteínas necesarias para las funciones nucleares (p. ej., factores de transcripción) deben entrar en el núcleo procedentes de los lugares de síntesis en el citoplasma. Además, muchas proteínas sufren un trasiego continuo entre el núcleo y el citoplasma.

Dependiendo de su tamaño, las moléculas pueden pasar a través del complejo del poro nuclear mediante uno de dos mecanismos diferentes (**Fig. 10.6**). Las moléculas pequeñas y algunas proteínas cuya masa molecular es inferior a aproximadamente 40 kd difunden libremente a través del poro en ambas direcciones, del citoplasma al núcleo y del núcleo al citoplasma. No obstante, la mayoría de las proteínas y ARN atraviesan el complejo del poro nuclear por un proceso de transporte selectivo. Estas proteínas y ARN son reconocidos por señales específicas que dirigen su transporte desde el núcleo al citoplasma o desde el citoplasma al núcleo.

La visualización de los complejos del poro nuclear por microscopia electrónica revela una estructura con una simetría de octámero organizada alrededor de un canal central grande (**Fig. 10.7**), que es la vía que utilizan las proteínas y los ARN para atravesar la envuelta nuclear. Otros estudios estructurales más detallados, incluyendo el análisis de imágenes por ordenador, han permitido construir modelos tridimensionales del complejo del poro nuclear (**Fig. 10.8**). Estos modelos muestran que el complejo del poro nuclear está formado por ocho radios ensamblados alrededor de un canal central. Estos radios están unidos a dos anillos, uno en la superficie nuclear

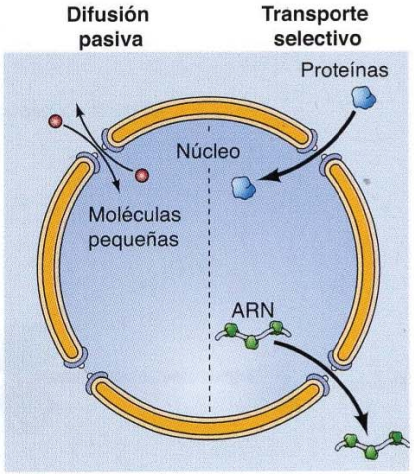


FIGURA 10.6 Tráfico molecular a través de los complejos del poro nuclear. Las moléculas pequeñas son capaces de atravesar libremente los canales abiertos del complejo del poro nuclear por difusión pasiva. Por el contrario, las macromoléculas (proteínas y ARN) se reconocen mediante señales específicas y se transportan mediante un mecanismo selectivo desde el núcleo al citoplasma o viceversa.

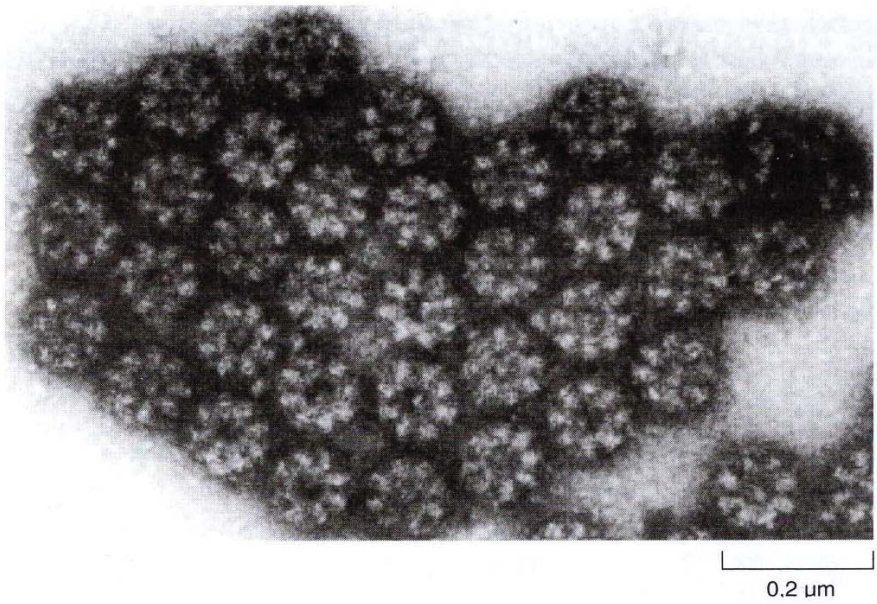


FIGURA 10.7 Micrografía electrónica de los complejos del poro nuclear. En esta vista frontal, los complejos del poro nuclear parecen estar constituidos por ocho subunidades estructurales alrededor de un canal central. (Cortesía del Dr. Ron Milligan, The Scripps Research Institute.)

◆ Muchos virus deben conseguir penetrar en el núcleo para replicarse. Siguiendo la infección de una célula, los retrovirus, como el VIH, transcriben inversamente su ARN genómico para sintetizar un provirus de ADN en el citoplasma. El VIH ha desarrollado mecanismos especiales para transportar el ADN proviral al núcleo donde puede ser transcrito (Cap.4).

y otro en la citoplasmática, y esta estructura de radio-anillo está anclada a la envuelta nuclear en los sitios de fusión entre las membranas nuclear interna y externa. Filamentos de proteínas se extienden desde el anillo citoplasmático y nuclear, formándose una estructura característica en forma de cesta en el lado nuclear.

Transporte selectivo de proteínas desde y hacia el núcleo

Varios millones de macromoléculas pasan selectivamente entre el núcleo y el citoplasma cada minuto. El mecanismo del tráfico selectivo a través de la

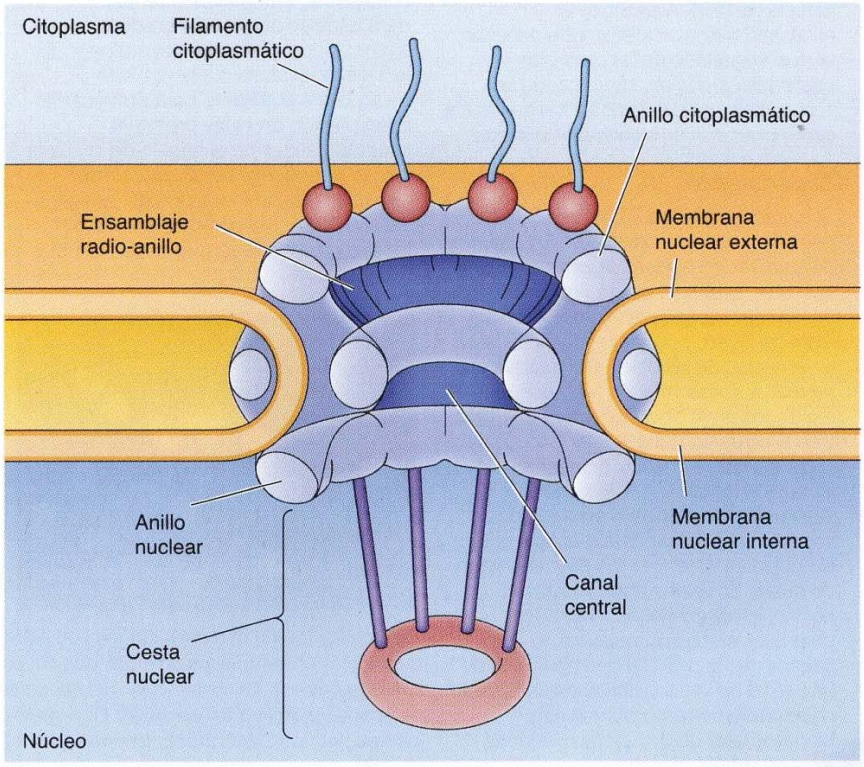


FIGURA 10.8 Modelo del complejo del poro nuclear. El complejo se organiza en ocho radios unidos a sendos anillos en la cara citoplasmática y nuclear de la envuelta nuclear. Toda la estructura radio-anillo se ensambla alrededor de un canal central. Los filamentos citoplasmáticos se extienden desde el anillo citoplasmático, y los filamentos que forman la estructura en forma de cesta se extienden desde el anillo nuclear.

EXPERIMENTO CLAVE

Identificación de las señales de localización nuclear

Corta secuencia de aminoácidos capaz de especificar la localización nuclear

Daniel Kalderon, Bruce L. Roberts, William D. Richardson y Alan E. Smith
National Institute for Medical Research, Mill Hill, London Cell,
Volumen 39, 1984, págs. 499-509

Alan Smith

Contexto

El mantenimiento del núcleo como un compartimento bioquímicamente distinto, requiere un mecanismo que permita segregar las proteínas entre el núcleo y el citoplasma. Los estudios realizados en la década de los 70 constataron que las moléculas pequeñas difundían rápidamente a través de la envuelta nuclear, pero que la mayoría de las proteínas no podían hacerlo. Por esta razón, parecía que las proteínas nucleares eran reconocidas de manera específica e importadas selectivamente al núcleo, desde su lugar de síntesis en los ribosomas citoplasmáticos.

Los experimentos anteriores realizados por Günter Blobel y colaboradores demostraron que las proteínas son etiquetadas para dirigirse al retículo endoplásmico por secuencias señal constituidas por un grupo corto de aminoácidos (véase Cap. 11). En este artículo de 1984, Alan Smith y colaboradores extendieron este principio para el etiquetado de las proteínas destinadas al núcleo, identificando una secuencia corta de aminoácidos que actúa como una señal de localización nuclear.

Experimentos

Se utilizó el antígeno T del virus SV40 como la proteína modelo para los estudios de localización nuclear en células animales. El antígeno T es una proteína de 94 kDa necesaria para la replicación del ADN del SV40, y normalmente se localiza en el núcleo de las células infectadas por este virus. Experimentos anteriores realizados en el laboratorio de Alan Smith y en el de Janet Butel (Lanford and Butel, 1984, *Cell* 37: 801-813), demostraron que la mutación de la Lys-128 siendo sustituida por treonina o asparragina impedía la acumulación del antígeno T en el núcleo, tanto en células de ratón como de mono. En vez de transportarse al núcleo, estos antígenos T mutados permanecían en el citoplasma, lo que sugería que la Lys-128 formaba parte de una señal de localización nuclear. Smith y colaboradores comprobaron esta hipótesis usando dos aproximaciones experimentales distintas.

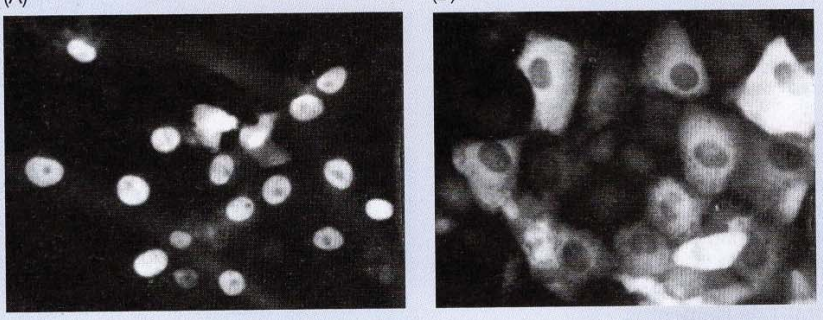
Primero, determinaron los efectos de varias deleciones sobre la localización subcelular del antígeno T. Se observó que los antígenos T mutados, con deleciones de las regiones de la cadena peptídica comprendidas entre los residuos de aminoácidos 1-126 o entre el residuo 136 y el extremo carboxilo terminal, se acumulaban normalmente en el núcleo. Por el contrario, las deleciones que afectaban desde el aminoácido 127 al 132, provocan la retención de los antígenos T en el citoplasma. Así, parecía que la secuencia de aminoácidos entre el residuo 127 y el 132 era la responsable de la localización nuclear del antígeno T.

Para determinar si esta secuencia de aminoácidos era capaz de dirigir otras proteínas al núcleo, los investigadores crearon quimeras en las cuales la secuencia de aminoácidos del antígeno T se fusionó con proteínas que normalmente se localizaban en el citoplasma. Estos experimentos demostraron que la adición de los aminoácidos 126 a 132 del antígeno T a la β-galactosidasa o a la piruvato quinasa era suficiente para provocar la acumulación de estas proteínas citoplasmáticas en el núcleo de la célula (véase figura). Por tanto, esta corta secuencia de aminoácidos del antígeno T del SV40 actúa como una señal de localización nuclear, que es suficiente y necesaria para etiquetar las proteínas de tal manera que sean transportadas al interior del núcleo.

Impacto

Como Smith y sus colaboradores sugirieron en su artículo de 1984, la señal de localización nuclear del antígeno T del SV40 ha resultado «ser un prototipo de secuencias similares en otras proteínas nucleares». Mediante el marcaje de las proteínas para su transporte al núcleo, estas señales son fundamentales para establecer la identidad bioquímica del núcleo y mantener la división de las células eucariotas en dos compartimentos: núcleo y citoplasma. En la actualidad se sabe que las señales de localización nuclear son reconocidas por receptores citoplasmáticos que transportan a sus proteínas sustrato al complejo del poro nuclear. Aunque los mecanismos de transporte a través del complejo del poro nuclear todavía no se han clarificado, la identificación de las señales de localización nuclear fue un avance fundamental para comprender el transporte de proteínas al núcleo.

(A) (B)



Las células fueron microinyectadas con ADN de plásmidos que codificaban proteínas quiméricas en las que los aminoácidos del antígeno T de SV40 se habían fusionado a la piruvato quinasa. La localización celular de las proteínas de fusión se determinó por microscopia de fluorescencia. (A) La proteína de fusión contiene una señal de localización nuclear de SV40 intacta (aminoácidos 126 a 132). (B) La señal de localización nuclear se ha inactivado por la deleción de los aminoácidos 131 y 132.

VÍDEO 10.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v10.1

Complejo del poro nuclear. El complejo del poro nuclear consiste en un conjunto de radios ensamblados a los anillos que rodean a un canal central.

envuelta nuclear se encuentra mejor caracterizado en el caso de las proteínas que son importadas desde el citoplasma al núcleo. Estas proteínas son las responsables de todas las características de la estructura y de la función del genoma; incluyen las histonas, las ADN polimerasas, las ARN polimerasas, factores de transcripción, factores de *splicing* y muchas otras. Estas proteínas se etiquetan para ser destinadas al núcleo con secuencias de aminoácidos específicas, denominadas **señales de localización nuclear**, que son reconocidas por los receptores de transporte nuclear que dirigen el transporte de proteínas a través del complejo del poro nuclear.

Alan Smith y colaboradores, en 1984, caracterizaron en detalle la primera señal de localización nuclear. Estos investigadores estudiaron el antígeno T del virus de simio SV40, una proteína codificada por el virus que inicia la replicación del ADN viral en las células infectadas (véase Cap. 7). Como era de esperar en una proteína que interviene en la replicación, el antígeno T se suele localizar en el núcleo. La señal responsable para su localización nuclear se identificó al encontrarse que una mutación en un único residuo de lisina impide que el antígeno T se transporte al núcleo, lo que da lugar a su acumulación en el citoplasma de la célula infectada. Estudios posteriores caracterizaron la señal de localización nuclear del antígeno T como una secuencia formada por siete aminoácidos: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Esta secuencia no sólo era necesaria para el transporte nuclear del antígeno T, sino que al añadirse a otras proteínas, normalmente citoplasmáticas, causaba su acumulación en el núcleo.

Desde entonces se han identificado señales de localización nuclear en muchas otras proteínas. La mayoría de estas secuencias, como la del antígeno T, son cortas y ricas en aminoácidos básicos (lisina y arginina). En muchos otros casos, sin embargo, los aminoácidos que forman la señal de localización nuclear están juntos pero no necesariamente contiguos en la secuencia. Por ejemplo, la señal de localización nuclear de la nucleoplasmina (una proteína que participa en el ensamblaje de la cromatina) consta de dos partes: una secuencia Lys-Arg separada por diez aminoácidos de otra secuencia de cuatro lisinas (**Fig. 10.9**). Tanto las secuencias Lys-Arg como Lys-Lys-Lys-Lys son necesarias para el transporte nuclear, pero los diez aminoácidos entre estas secuencias pueden sufrir mutaciones sin afectar al transporte nuclear. Debido a que esta secuencia de localización nuclear está compuesta por dos elementos separados, se denomina secuencia bipartita. Muchas señales de localización nuclear, como las del antígeno T y la nucleoplasmina, consisten en residuos de aminoácidos básicos; a menudo se denominan señales de localización nuclear «clásicas». Además, algunas proteínas contienen otra localización nuclear, que es reconocida por diferentes receptores de transporte.

ANIMACIÓN 10.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a10.1

Importación y exportación nuclear. Las proteínas se dirigen hacia el núcleo o salen de él a través de señales de localización nuclear o señales de exportación nuclear, respectivamente, que hacen posible su reconocimiento por receptores que dirigen su transporte a través del complejo del poro nuclear.

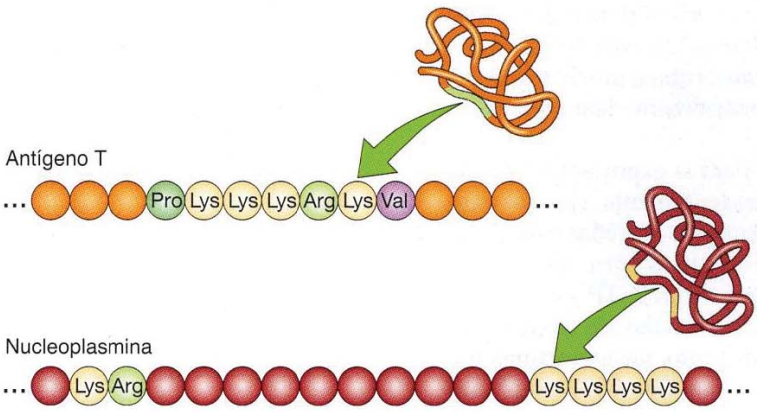


FIGURA 10.9 Señales de localización nuclear. La señal de localización nuclear del antígeno T es una corta secuencia de aminoácidos. Por el contrario, la señal de localización nuclear de la nucleoplasmina es una secuencia bipartita, formada por una secuencia Lys-Arg separada por diez aminoácidos de otra secuencia Lys-Lys-Lys-Lys.

Las proteínas con una señal de localización nuclear clásica son conocidas como **importinas** (debido a su actividad transportadora de proteínas al núcleo) reconocen las señales de localización nuclear. Las importinas actúan conjuntamente con una proteína de unión a GTP denominada **Ran**, que controla la dirección del movimiento a través del poro nuclear. La Ran es uno de los varios tipos de proteínas de pequeño tamaño que se unen a GTP cuya conformación y actividad están reguladas por la unión e hidrólisis de GTP. En el Capítulo 9 se analizaron otros ejemplos de proteínas de unión a GTP, entre ellas varios de los factores de traducción que intervienen en la síntesis de proteínas (véanse Figs. 9.14 y 9.21) y Ras (véase Fig. 9.40). Las conformaciones y las actividades de estas proteínas están reguladas por el hecho de que estén unidas a GTP o a GDP. En el caso de Ran, las enzimas que estimulan la hidrólisis de GTP a GDP se asocian con los filamentos citoplásmicos del complejo del poro nuclear, mientras que las que estimulan el intercambio de GDP por GTP se asocian con la cromatina dentro del núcleo. En consecuencia, existe una alta concentración de Ran/GTP en el núcleo, que determina la direccionalidad del transporte nuclear.

VÍDEO 10.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v10.2

En el núcleo. Las proteínas pasan a través del complejo del poro nuclear mediante un proceso de transporte selectivo.

En la **Figura 10.10** se resume el ciclo clásico de importación nuclear. La importación de proteínas se inicia cuando la importina se une a la señal de localización nuclear de una proteína de carga en el citoplasma. Este complejo carga/importina (proteína) se une entonces a proteínas de los filamentos citoplásmicos del complejo del poro nuclear, y se produce el transporte gracias a la interacción de las importinas con las proteínas que revisten el canal central del poro. Una vez que el complejo importina/carga llega a la cara nuclear de la membrana, la Ran/GTP se une a la importina. Esto provoca un cambio en la conformación de la importina, que altera el complejo importina/carga, desplazando a la proteína y liberándola al interior del núcleo.

El ciclo se mantiene porque la importina-Ran/GTP se exporta a continuación a través del complejo del poro nuclear. En el citoplasma el GTP es hidrolizado a GDP. Esto libera a la importina de modo que puede unirse a una nueva proteína transportadora en el citoplasma y volver a ser transportada al interior nuclear por su propio receptor de importe (una proteína denominada NTF2), donde el Ran/GTP es regenerado por la acción del factor de intercambio de nucleótidos guanina-Ran.

Algunas proteínas permanecen en el interior del núcleo una vez transportadas desde el citoplasma, pero muchas otras viajan continuamente entre el núcleo y el citoplasma. Algunas de estas proteínas actúan como transportadores (*carriers*) de otras moléculas, como los ARN; otras coordinan las funciones nucleares y citoplasmáticas (p. ej., regulando la actividad de los factores de transcripción). Las proteínas se etiquetan para ser exportadas del núcleo mediante una secuencia de aminoácidos específica, llamada **señal de exportación nuclear** que a menudo es rica en el aminoácido hidrófobo leucina. Al igual que las señales de localización nuclear, las señales de exportación nuclear son reconocidas por receptores en el interior del núcleo **exportinas,** que dirigen el transporte de las proteínas a través del complejo del poro nuclear al citoplasma. Al igual que las importinas, muchas exportinas pertenecen a una familia de receptores de transporte nuclear denominados **carioferinas** (**Tabla 10.1**).

Las exportinas se unen a Ran, necesaria tanto para la exportación nuclear como la importación nuclear (**Fig. 10.11**). Sorprendentemente, sin embargo, Ran/GTP promueve la formación de complejos estables entre las exportinas y las proteínas diana, mientras que disocia los complejos entre las importinas y sus proteínas diana. Este efecto de la unión de Ran/GTP sobre las exportinas dirige el movimiento de las proteínas con señales de exportación (NES) nuclear desde el núcleo al citoplasma. Por tanto, las exportinas forman complejos estables con sus proteínas diana y con Ran/GTP en el inte-

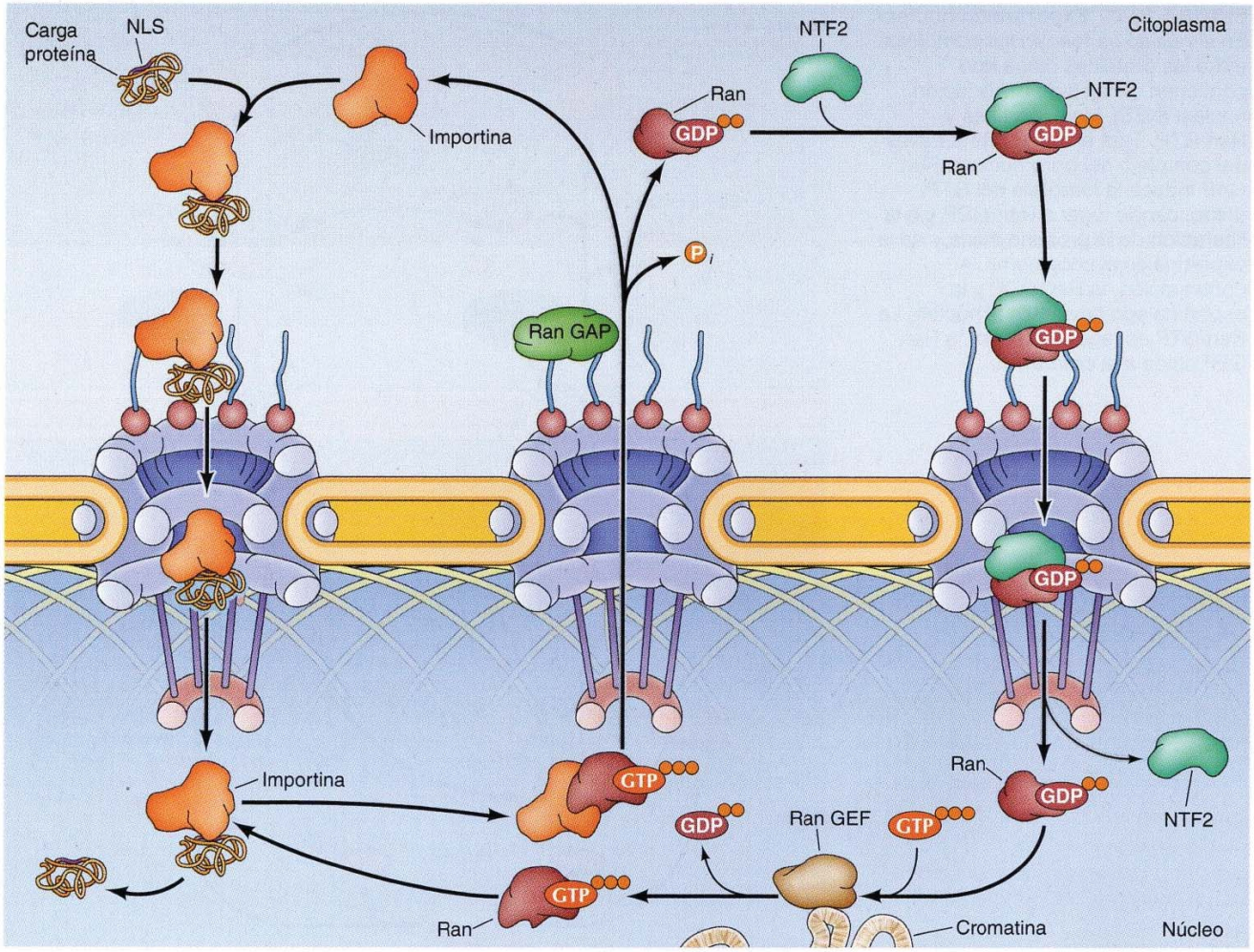


FIGURA 10.10 Importe de proteínas a través del complejo del poro nuclear. El transporte comienza cuando una importina reconoce la secuencia de localización nuclear (NLS) de una proteína-carga. El complejo carga/importina se une a las proteínas del poro nuclear en los filamentos citoplásmicos, y es transportado a través del poro. En la cara nuclear de la membrana, la Ran/GTP se une a la importina, alterando el complejo carga/importina y liberando a la proteína al interior del núcleo. El complejo importina-Ran/GTP se reexporta a través del poro nuclear y la proteína activadora de GTPasa (Ran-GAP) asociada con filamentos citoplásmicos hidroliza la GTP en Ran a GDP, liberando la importina. A continuación, la Ran/GDP se transporta de nuevo al núcleo en asociación con su propio receptor de importación, NTF2. En el núcleo, Ran GEF (unido a cromatina) estimula el intercambio de GDP unido a Ran para GTP, lo que lleva a la conversión de Ran/GDP en Ran/GTP y al mantenimiento de una alta concentración de Ran/GTP dentro del núcleo.

rior del núcleo. Una vez que se ha producido el transporte al lado citosólico de la envuelta nuclear, la hidrólisis de GTP y la liberación de Ran/GDP provoca la disociación de la proteína diana, que es liberada en el citoplasma. Las exportinas así como Ran/GDP, se reciclan a través del complejo del poro nuclear para su reutilización.

Transporte de ARN

Mientras muchas proteínas se transportan selectivamente desde el citoplasma al núcleo, los ARN que intervienen en la síntesis de proteínas son exportados desde el núcleo al citoplasma. Los ARN se transportan a través del

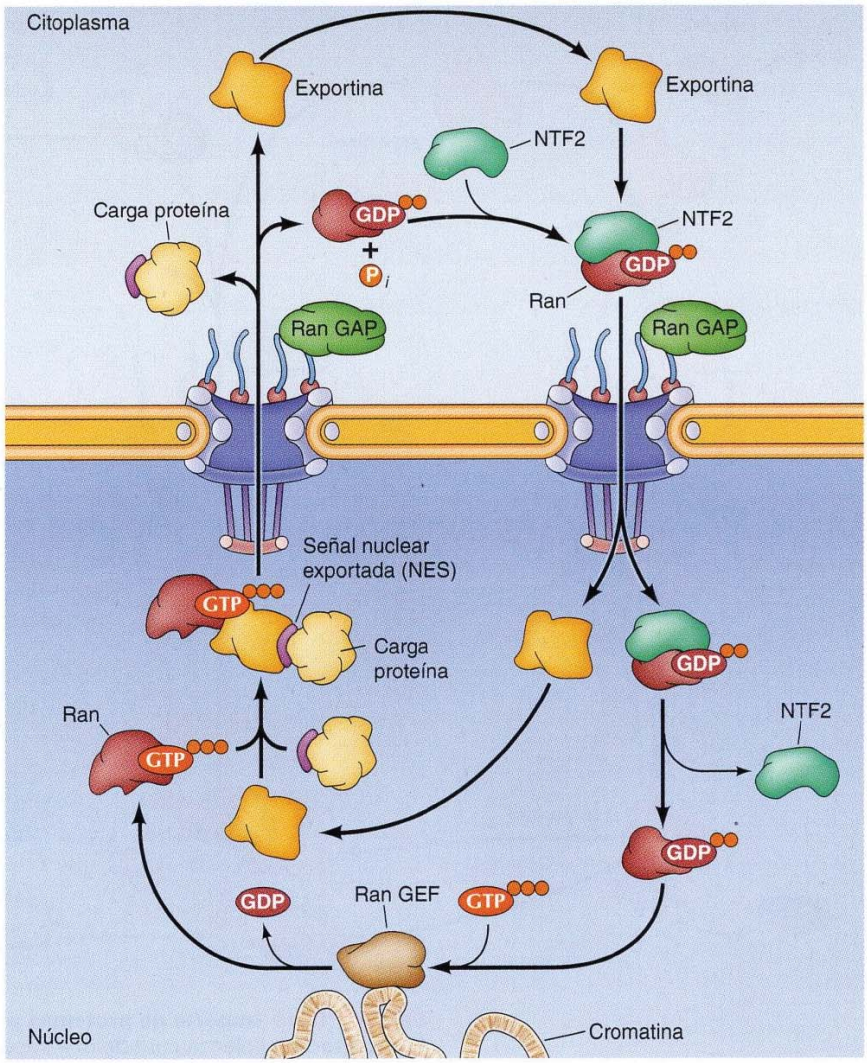


FIGURA 10.11 Exportación nuclear. En el núcleo se forman los complejos entre las proteínas diana que contienen señales de exportación nuclear (NES), las exportinas y Ran/GTP. Tras el transporte a través del complejo del poro nuclear, Ran GAP induce la hidrólisis del GTP unido, dando lugar a Ran/GDP y a la liberación de la proteína diana y de la exportina en el citoplasma. A continuación, la Ran/GDP y la exportina son devueltas al núcleo. La Ran/GTP es regenerada por la Ran GEF unida a la cromatina.

TABLA 10.1 Carioferinas con sustratos conocidos

Carioferina	Sustratos
Importe	
Importina (Dímero Kapα/Kapβ 1)	Proteínas con una señal de localización nuclear de aminoácidos básica (p. ej., nucleoplasmina)
Esnurportina/Kapβ 1	RNPsn (U1, U2, U4, U5)
Transportina/Kapβ 2	Proteínas de unión a ARNm, proteínas ribosómicas
Importina7/dímero Kapβ 1	Histona H1, proteínas ribosómicas
Exporte	
Crm1	Proteínas con una señal de exportación rica en leucina, esnurportina, ARNsn, subunidades ribosómicas
CAS	Kapα
Exportina-t	ARNt
Exportina-5	ARNmi

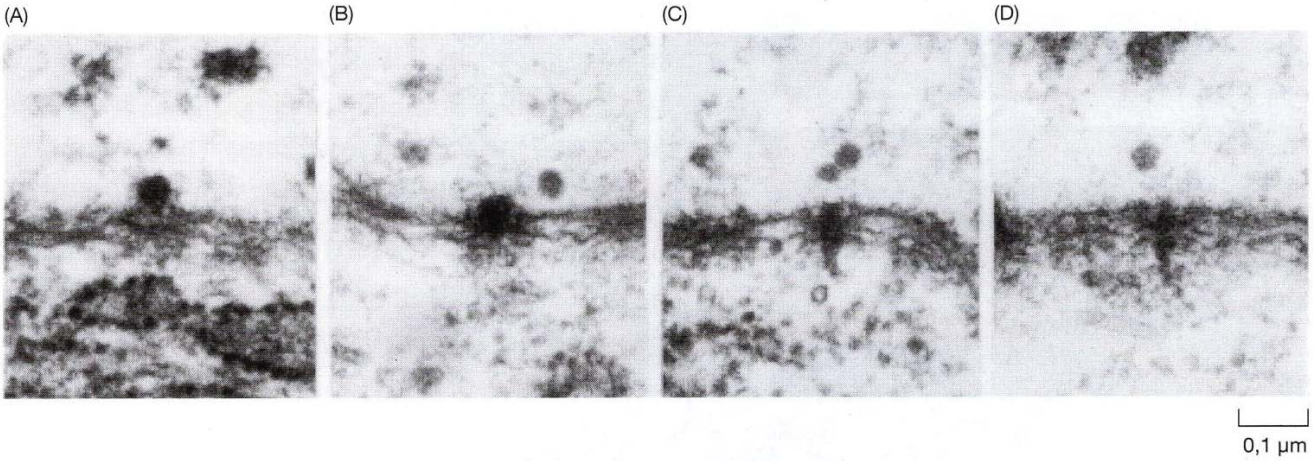


FIGURA 10.12 Transporte de un complejo ribonucleoproteínico. Las células de las glándulas salivares de los insectos producen grandes complejos ribonucleoproteínicos (RNP), formados por 35 a 40 kilobases de ARN y con un peso molecular total aproximado de 30 millones de daltons. Esta serie de micrografías electrónicas muestra la unión de una RNP a un complejo del poro nuclear (A) y el despliegue del ARN durante su translocación al citoplasma (B-D). (De H. Mehlin y cols., 1992. *Cell* 69:605.)

complejo del poro nuclear en forma de complejos de ribonucleoproteínas (**Fig. 10.12**). La exportación de los ARNt, ARNr y ARNmi está mediada por exportinas de carioferina específicas (véase Tabla 10.1), tal como se describe en la Figura 10.11. Los precursores de ARNt y ARNmi son exportados desde el núcleo por la exportina-t y la exportina-5, respectivamente, que se unen de forma directa a los ARN (véase Tabla 10.1). Los ARN ribosómicos se asocian primero con proteínas ribosómicas en el nucléolo, y las subunidades ribosómicas 40S y 60S nacientes son transportadas por separado al citoplasma (véase Fig. 10.28) por la exportina Crm1. Su exportación desde el núcleo está mediada por señales de exportación nuclear presentes en las proteínas dentro del complejo de subunidades ribosómicas.

Los ARNm son exportados por un mecanismo diferente en el que no intervienen las carioferinas y que es independiente de Ran (**Fig. 10.13**). Los pre-ARNm están asociados a un conjunto de al menos 20 proteínas en todo el procesamiento del núcleo y en el eventual transporte al citoplasma. Estas proteínas incluyen un complejo de exportador de ARNm distinto, que es reclutado para los pre-ARNm en el núcleo en concierto con la terminación del *splicing* y la poliadenilación. El complejo exportador transporta entonces los ARNm a través de los poros nucleares. La direccionalidad del proceso es establecida por una ARN helicasa localizada en la cara citoplásmica del complejo del poro nuclear. La helicasa remodela el ARNm y elimina el complejo exportador en el lado citoplásmico del poro. Así, el ARNm se libera en el citoplasma y evita su transporte de nuevo al núcleo.

A diferencia de los ARNm, los ARNmi, los ARNt y los ARNr, que actúan en el citoplasma, muchos ARN no codificantes, entre ellos los ARNsn que intervienen en el *splicing* de los pre-ARNm y los ARNsno implicados en el procesamiento del ARNr (como se expone más adelante en el capítulo), actúan dentro del núcleo. Los ARNsno permanecen en el núcleo, pero los ARNsn son transportados inicialmente desde el núcleo al citoplasma por la exportina Crm1 (**Fig. 10.14**). En el citoplasma, los ARNsn se asocian con las proteínas para formar RNPsn. A continuación, las secuencias presentes en las proteínas RNPsn son reconocidas por una importina denominada snuportina, que media en su transporte de nuevo al núcleo.

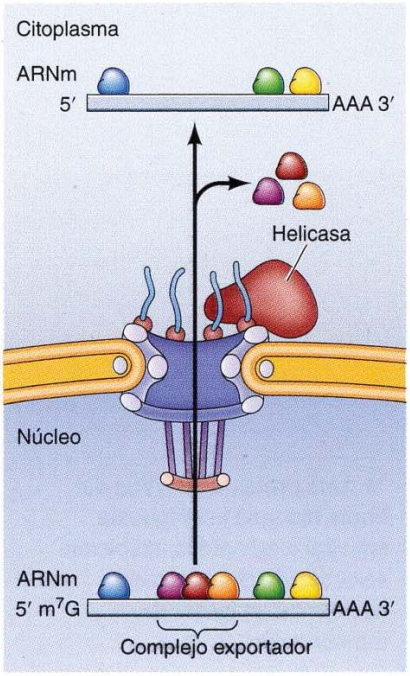


FIGURA 10.13 Exportación de ARNm. Siguiendo el procesamiento, los ARNm están unidos por un complejo exportador, que media su transporte a través del complejo del poro nuclear. Una helicasa asociada a la cara citoplásmica del complejo nuclear del poro libera entonces el ARNm en el citoplasma.

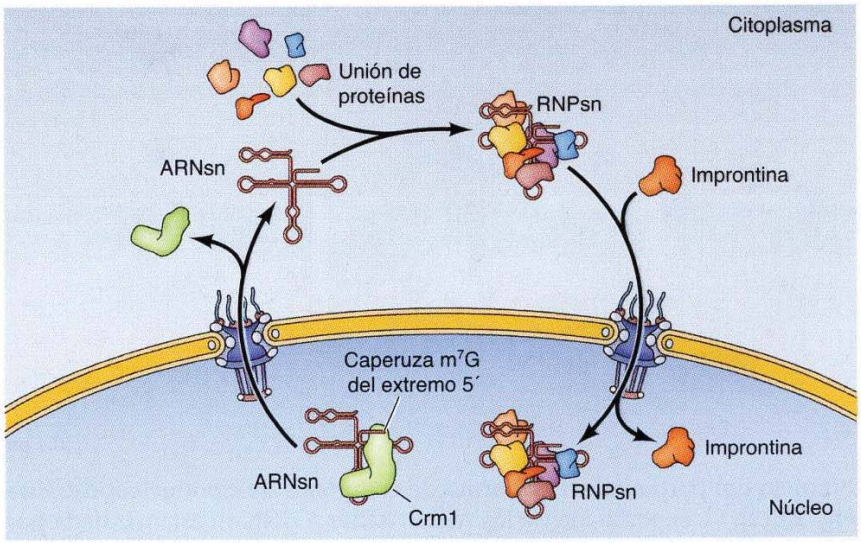


FIGURA 10.14 Transporte de los ARNsn entre el núcleo y el citoplasma. Los ARN pequeños nucleares son exportados primero desde el núcleo al citoplasma, por una exportina (Crm1) que reconoce la caperuza de 7-metilguanosina del extremo 5'. En el citoplasma, los ARNsn se asocian a proteínas para generar RNPsn que se transportan de nuevo al núcleo.

Regulación del transporte de proteínas al núcleo

El transporte de proteínas al núcleo es un importante nivel en el que las actividades de las proteínas nucleares pueden ser controladas. Los factores de transcripción sólo son funcionales cuando están presentes en el núcleo, por lo que la regulación de su transporte al núcleo es otra forma de control de la expresión génica. Como se discutirá en el Capítulo 16, el transporte regulado al núcleo de los factores de transcripción y de las proteína quinasas tiene un papel importante en el control del comportamiento de las células a través de un mecanismo de transmisión de señales recibidas en la superficie celular hacia el núcleo.

En uno de los mecanismos de regulación, los factores de transcripción (u otras proteínas) se asocian con proteínas citoplasmáticas que enmascaran las señales de localización nuclear; puesto que ya no se reconocen estas señales, las proteínas permanecen en el citoplasma. Un buen ejemplo lo aporta el factor de transcripción NF-κB, que se activa en respuesta a una variedad de señales extracelulares en las células de mamíferos **(Fig. 10.15)**. En células no estimuladas, NF-κB se encuentra formando un complejo inactivo con una proteína inhibidora (IκB) en el citoplasma. La unión a IκB parece enmascarar la señal de localización nuclear de NF-κB, y se impide su transporte al núcleo. En las células estimuladas, IκB se fosforila y degrada por proteólisis mediada (véase Fig. 9.46), por ubiquitinas, lo que permite que NF-κB entre al interior del núcleo y active la transcripción de sus genes diana.

El transporte al interior del núcleo de otros factores de transcripción está regulado directamente por su fosforilación, más que por la asociación con proteínas inhibidoras (véase Fig. 10.15). Por ejemplo, el factor de transcripción de levaduras Pho4 se fosforila en un residuo de serina adyacente a su señal de localización nuclear. La fosforilación en este punto inhibe que Pho4 interfiera con su importe nuclear. Bajo las condiciones apropiadas, la defosforilación regulada de este punto activa a Pho4 permitiendo su translocación al núcleo.

◆ Una proteína del virus del Ébola bloquea la respuesta antiviral mediante la inhibición selectiva de la importación nuclear de un factor de transcripción.

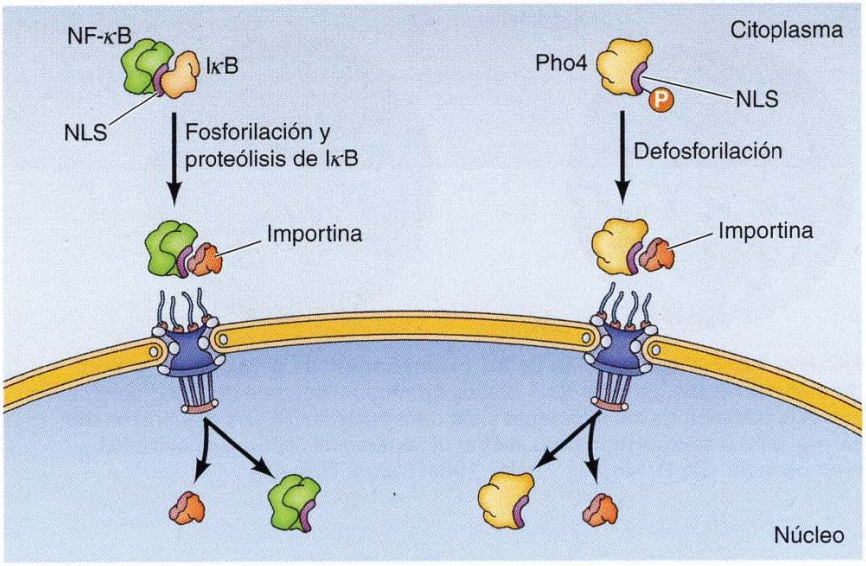


FIGURA 10.15 Regulación del transporte al núcleo de factores de transcripción. El factor de transcripción NF-κB forma un complejo inactivo con IκB, que enmascara su secuencia de localización nuclear (NLS) y se retiene en el citoplasma. En respuesta a una señal extracelular adecuada, IκB es fosforilado y degradado por proteólisis, permitiendo la entrada de NF-κB al núcleo. En cambio, el factor de transcripción Pho4 de levadura es retenido en el citoplasma debido a la fosforilación de una región próxima a la secuencia de localización nuclear. La desfosforilación regulada expone la NLS y permite que Pho4 sea transportado al núcleo en la etapa adecuada del ciclo celular.

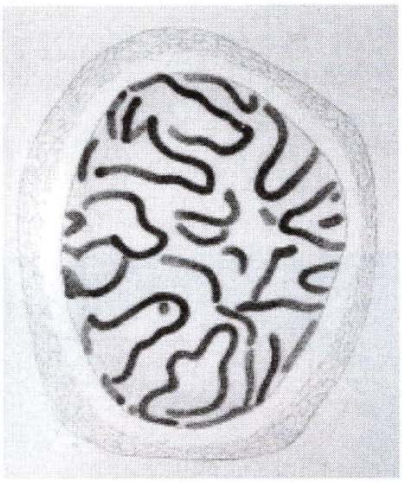
Organización de cromosomas

La cromatina experimenta una intensa condensación durante la mitosis para formar los cromosomas compactos de la metafase que se distribuyen en los núcleos hijos. Durante la interfase, la mayor parte de la cromatina se descondensa y se distribuye por el núcleo. Aunque en la interfase la cromatina aparece distribuida de manera uniforme, los cromosomas ocupan en realidad distintas regiones del núcleo y se organizan de manera que la actividad transcripcional de un gen está correlacionada con su posición. Además, las actividades principales de la replicación y transcripción de ADN tienen lugar en regiones agrupadas dentro del núcleo.

Territorios cromosómicos

La distribución no aleatoria de la cromatina en el núcleo en la interfase fue sugerida por primera vez en 1885 por Carl Rabl, quien propuso que cada cromosoma ocupa un territorio distinto, con los centrómeros y los telómeros unidos a lados opuestos de la envuelta nuclear (**Fig. 10.16**). Este modelo básico de la organización cromosómica fue confirmado casi cien años más tarde (en 1984) por estudios detallados de los cromosomas de politeno en las glándulas salivares de *Drosophila*. En lugar de arrollarse unos en torno a otros de manera aleatoria, se descubrió que cada cromosoma ocupa una región discreta del núcleo, denominada territorio cromosómico (**Fig. 10.17**).

(A)



(B)

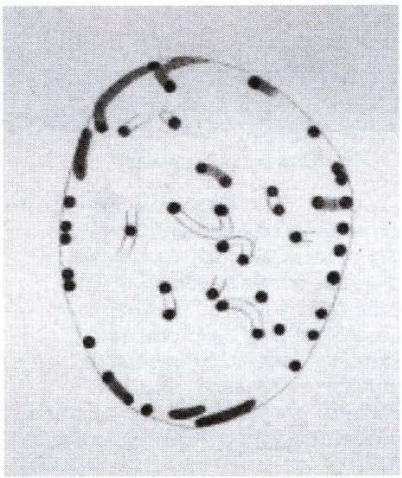


FIGURA 10.16 Organización cromosómica. Reproducción de unos bocetos por Carl Rabl de cromosomas en células de salamandra. (A) Cromosomas completos. (B) Sólo los telómeros (localizados en la membrana nuclear). (De C. Rabl, 1885. *Morphologisches Jahrbuch* 10: 214.)

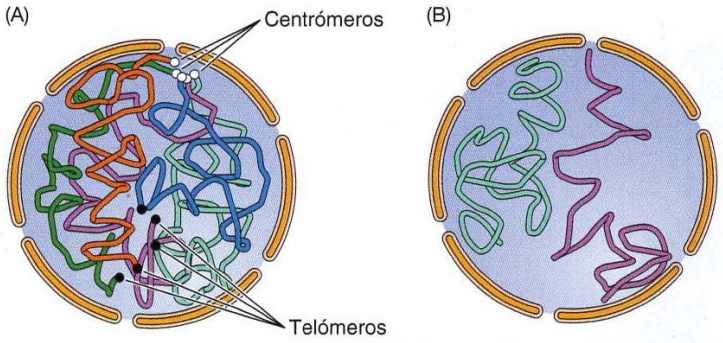
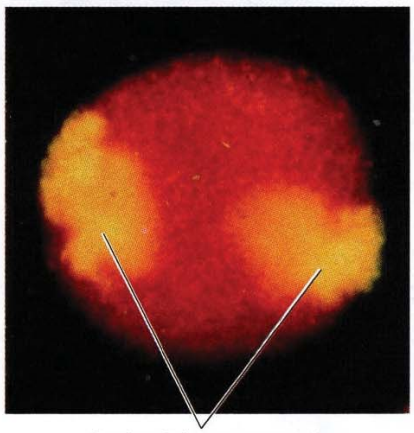


FIGURA 10.17 Organización de los cromosomas de *Drosophila*. (A) Un modelo del núcleo, mostrando 5 brazos cromosómicos con distintos colores. Se indica la posición de los telómeros y los centrómeros. (B) Los dos brazos del cromosoma 3 se muestran para ilustrar la separación topológica entre los cromosomas. (De D. Mathog y cols., 1984. *Nature* 308: 414.)

Estudios más recientes han mostrado la organización de los cromosomas dentro del núcleo mediante dos enfoques complementarios. En primer lugar, se ha utilizado hibridación *in situ* con sondas fluorescentes específicas de secuencias repetidas en cromosomas individuales para visualizar la posición de los cromosomas dentro del núcleo, lo que confirma que los cromosomas individuales ocupan territorios distintos dentro de los núcleos de células de mamíferos (**Fig. 10.18**). En segundo lugar, se han analizado las asociaciones entre cromosomas en células vivas mediante técnicas de captura de conformación de cromosomas (3C). Tal como se indica en el Capítulo 8, estos métodos identifican los lugares de interacciones entre regiones cromosómicas por reticulación de secuencias de ADN en interacción, que pueden amplificarse e identificarse a continuación mediante secuenciación de alto rendimiento. Las vistas globales de la organización cromosómica proporcionadas por los métodos 3C en el nivel molecular han confirmado y extendido los resultados obtenidos por hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH). La mayor parte de las interacciones identificadas por técnicas 3C tiene lugar entre regiones situadas en el mismo cromosoma, y no entre cromosomas diferentes, lo cual concuerda con la conclusión de que los cromosomas ocupan territorios distintos dentro del núcleo. Además, aparentemente el centrómero divide cada cromosoma en dos dominios distintos, de manera que los dos brazos de cada cromosoma no interaccionan entre sí.

Localización de cromatina y actividad transcripcional

La mayor parte de la cromatina en las células en la interfase (**eucromatina**) está descondensada y es transcripcionalmente activa, pero parte de la cromatina (**heterocromatina**) está altamente condensada y no se transcribe. La heterocromatina incluye secuencias de ADN que en general no se transcriben, de manera que las secuencias altamente repetitivas presentes en los centrómeros y los telómeros, por ejemplo los genes que en la actualidad no están transcritos en la célula sujeta a análisis pero sí en otros tipos de células diferenciados, en distintos momentos del ciclo celular, o en respuesta a diferentes señales extracelulares, como las hormonas. La actividad transcripcional de los dominios cromosómicos está correlacionada con su posición en el núcleo. La heterocromatina inactiva transcripcionalmente se asocia con frecuencia con la envuelta celular o la periferia del nucléolo, mientras que la cromatina transcripcionalmente activa está situada con preferencia en el interior del núcleo (**Fig. 10.19**).



Copias del cromosoma 4

FIGURA 10.18 Organización de los cromosomas en los núcleos de mamíferos. Sondas fluorescentes dirigidas contra secuencias del cromosoma 4 en células humanas. Las dos copias del cromosoma, identificadas con fluorescencia amarilla, se localizan en zonas distintas del núcleo. (De A. I. Lamond y W. C. Earnshaw, 1999. *Science* 280: 547.)

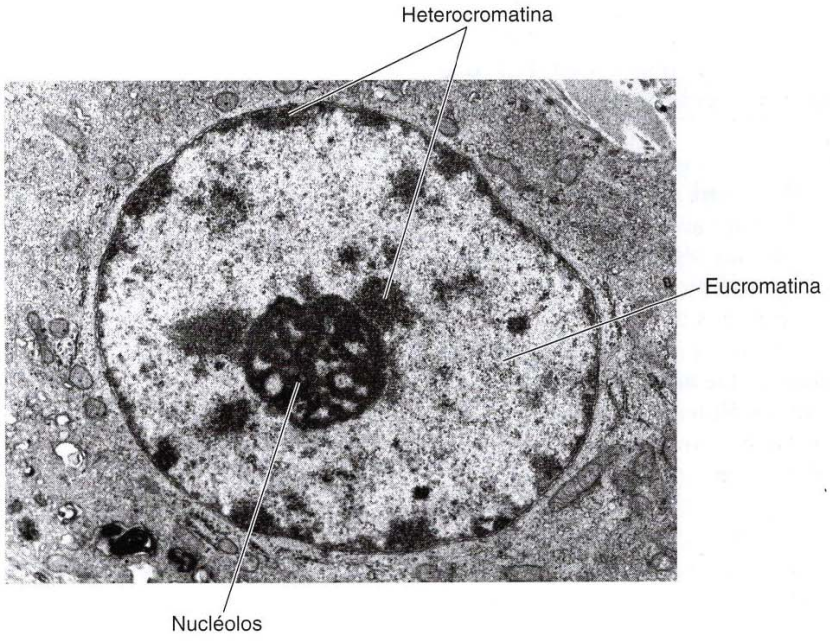


FIGURA 10.19 Heterocromatina en los núcleos en interfase. La eucromatina está distribuida en todo el núcleo. La heterocromatina se asocia con la envuelta nuclear y con el nucléolo.

◆ Los protozoos ciliados contienen dos tipos de núcleos: un macronúcleo poliploide que contiene los genes transcripcionalmente activos, y uno o más micronúcleos diploides transcripcionalmente inactivos que participan en la reproducción sexual.

Estas observaciones microscópicas de localización de la cromatina se han extendido mediante estudios más refinados de la localización de dominios de cromatina activos o inactivos transcripcionalmente. Por ejemplo, algunos cromosomas humanos son ricos en genes transcritos, mientras que otros tienen un número de genes relativamente bajo. Una comparación de los territorios ocupados por dichos cromosomas indica que los ricos en genes están situados en el centro del núcleo, mientras que los de pocos genes se sitúan en la periferia nuclear (**Fig. 10.20A**). Por otra parte, las sondas FISH específicas para genes activos indican que las regiones transcritas de un cromosoma se extienden fuera del territorio principal de dicho cromosoma, hacia el interior del núcleo (**Fig. 10.20B**). Este hecho apunta a que los genes transcritos activamente pueden saltar desde sus territorios cromosómicos, tal vez para facilitar la transcripción o el procesamiento del ARN.

El análisis de captura de conformación de cromosomas (3C) ha indicado que los genomas se dividen en una serie de dominios asociados topológicamente (TAD), de forma que las regiones dentro de un dominio interaccionan frecuentemente con otro, aunque sólo raras veces con regiones de otros dominios (véase Fig. 8.20). En los seres humanos, estos dominios cromosómicos se sitúan aproximadamente entre cien y varios miles de kb y, según se cree, corresponden a regiones dentro de las cuales pueden interaccionar los promotores y los estimuladores, así como a las regiones cromosómicas ca-

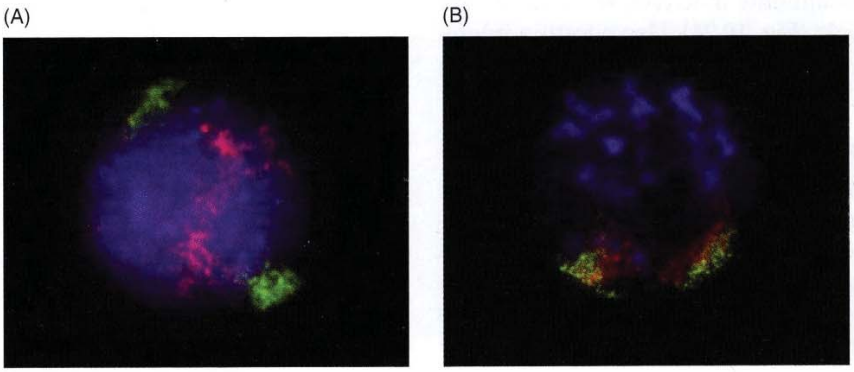


FIGURA 10.20 Hibridación *in situ* fluorescente de cromosomas activos e inactivos transcripcionalmente. (A) Hibridación *in situ* fluorescente con sondas para el cromosoma 19 rico en genes (rojo) y el cromosoma 18 de pobre dotación génica (verde). (B) Hibridación con sondas que cubren todo el cromosoma 2 de ratón (verde) o sólo las secuencias de exones de dicho cromosoma (rojo). (De W. A. Bickmore y B. van Steensel, 2013. *Cell* 152: 1270).

racterizadas por modificaciones de histonas asociadas con cromatina reprimida frente a la transcrita activamente. Las fronteras de estos dominios cromosómicos contienen múltiples sitios de unión para cohesina y CTCF, que actúan, según se piensa, como una proteína arquitectónica encargada de regular la organización del genoma.

Los dominios de cromatina que están localizados en la periferia del núcleo han sido identificados por varios métodos, entre ellos el uso de inmunoprecipitación de cromatina (véase Fig. 8.23), para aislar regiones de ADN que están asociadas con lamininas nucleares. En las células humanas se han identificado entre 1.000 y 1.500 dominios cromosómicos que interaccionan con la lámina nuclear. Estos dominios (denominados **dominios asociados a lámina**, o **LAD**), contienen aproximadamente entre 10 y 10.000 kb y cubren en total en torno al 40% del genoma humano. De acuerdo con la localización de heterocromatina inactiva transcripcionalmente en la periferia nuclear, los genes presentes en LAD suelen estar reprimidos transcripcionalmente. En particular, los LAD se alinean bien con los dominios de cromatina definidos por modificación de histonas y con los dominios asociados topológicamente (TAD) que limitan las interacciones entre promotores/estimuladores. Así pues, al parecer los LAD corresponden a dominios de heterocromatina inactivos transcripcionalmente que están asociados con la lámina nuclear. Los mecanismos responsables de la interacción de cromatina con la lámina nuclear no se conocen bien todavía y pueden incluir la unión de cromatina a lamininas y proteínas de la membrana nuclear interna, tales como emerina y el receptor de laminina B (véase Fig. 10.5). Las interacciones que median en la asociación de heterocromatina con la lámina nuclear incluyen la unión del receptor de laminina B a la proteína de heterocromatina 1 (HP1). La HP1 se une a residuos metilados de histona H3 lisina 9, que son característicos de la cromatina transcripcionalmente activa (véase Fig. 8.32). De forma similar, la emerina interacciona con una histona desacetilasa, que se asocia también con la represión transcripcional y la condensación de cromatina.

Además de la localización de heterocromatina en la lámina nuclear, el nucléolo está rodeado por heterocromatina (véase Fig. 10.19). Las regiones de cromatina asociadas con el nucléolo (llamados **dominios asociados al nucléolo** o **NAD**) se han identificado mediante secuenciación del ADN ligado a nucléolos aislados. Es interesante observar que las secuencias de ADN presentes en los NAD se superponen sustancialmente con las presentes en los LAD. Esto indica que los genes transcripcionalmente inactivos pueden localizarse en la lámina nuclear o en la periferia de los nucléolos en células diferentes.

Considerados en conjunto, estos hallazgos sugieren que los cromosomas se dividen en dos dominios correspondientes a unidades y regiones transcripcionales de modificación de cromatina. Los dominios transcripcionalmente inactivos suelen encontrarse en el interior del núcleo, mientras que los dominios de cromatina transcripcionalmente inactivos se sitúan en general en la lámina nuclear o en el nucléolo (**Fig. 10.21**). Una cuestión interesante aún pendiente de respuesta es la medida en que la localización de un gen en el núcleo es una causa o un efecto de su actividad transcripcional.

Fábricas de replicación y transcripción

La organización funcional de la cromatina está indicada adicionalmente por la localización de procesos clave en regiones agrupadas del núcleo, que representan grandes complejos de las proteínas implicadas en un proceso en particular. Por ejemplo, la replicación de ADN tiene lugar dentro de regiones discretas denominadas **fábricas de replicación**. Las fábricas de replicación contienen lugares agrupados de replicación de ADN dentro de los cua-

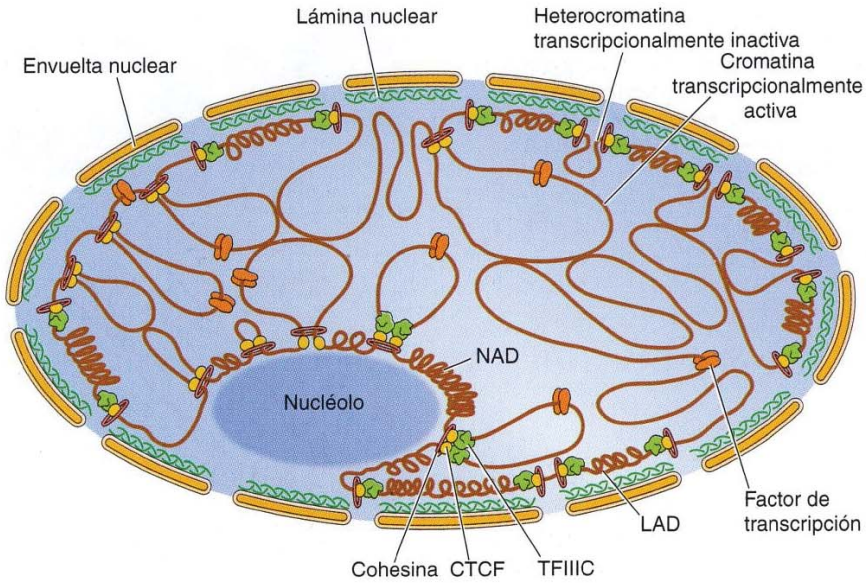


FIGURA 10.21 Distribución de cromatina transcripcionalmente activa e inactiva. Los dominios de heterocromatina transcripcionalmente inactiva se asocian en general con la lámina (LAD) o con el nucléolo (NAD). Los dominios transcripcionalmente activos están situados en el interior del núcleo. Las fronteras entre dominios contienen múltiples uniones para CTCF y cohesina.

les tiene lugar la replicación de múltiples moléculas de ADN. Estos sitios discretos de replicación de ADN fueron definidos inicialmente por experimentos en los cuales el ADN recién sintetizado se visualizó dentro del núcleo celular por marcado de células con bromodesoxiuridina, un análogo de la timidina que se incorporó en ADN y después se detectó mediante tinción con anticuerpos fluorescentes (**Fig. 10.22A**). Estos lugares agrupados de ADN recién sintetizado representan también sitios concentrados de las proteínas que intervienen en la replicación de ADN (**Fig. 10.22B**), lo que indica que son grandes complejos de proteínas implicados en la síntesis de ADN. En el núcleo de las células de mamíferos existen varios centenares de estos sitios. Puesto que, en un momento dado, en una célula de mamífero diploide pueden estar activos aproximadamente 4.000 orígenes de replicación, cada uno de estos sitios agrupados de replicación de ADN debe contener múltiples horquillas de replicación, probablemente en el orden de 5 a 50 horquillas de replicación por fábrica.

La transcripción se produce también en sitios agrupados (**fábricas de transcripción**) que contienen ARN recién sintetizado y que están muy enriquecidos con ARN polimerasas activas y factores de transcripción. Se estima que un factor de transcripción contiene aproximadamente ocho molécu-

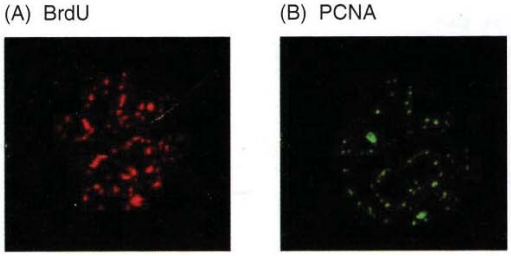


FIGURA 10.22 Fábricas de replicación. (A) El ADN recién replicado se marcó con una breve exposición de las células a la bromodesoxiuridina (BrdU), que se incorpora en el ADN en lugar de la timidina. Esta sustitución permite la detección del ADN recién sintetizado por inmunofluorescencia seguida de tinción con un anticuerpo contra BrdU. Cabe observar que el ADN recién replicado (rojo) está presente en grupos discretos distribuidos por todo el núcleo. (B) Los mismos grupos representan puntos concentrados de la proteína de replicación de ADN marcada por GFP (verde) PCNA (véase Fig. 7.7). (De Leonhart y cols., 2000. *J. Cell Biol.* 149: 271).

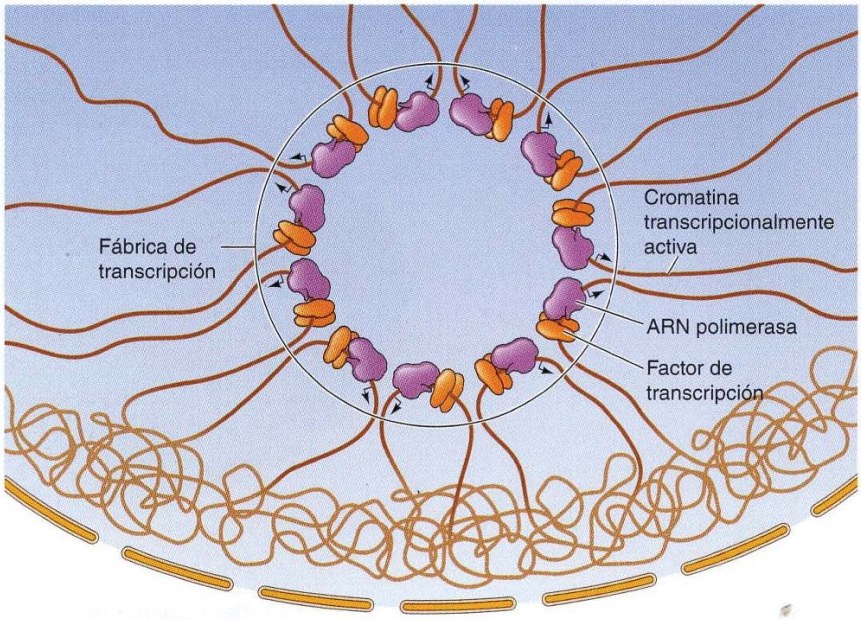


FIGURA 10.23 Fábricas de transcripción. Las fábricas de transcripción son sitios agrupados de ARN polimerasas y factores de transcripción en los que se transcriben múltiples dominios de cromatina activa.

las de ARN polimerasa. Varios loci cromosómicos pueden compartir la misma fábrica de transcripción y, según se cree, los genes activos saltan y son impulsados a través de una fábrica cuando se produce la transcripción (**Fig. 10.23**). En algunos casos, en una misma fábrica pueden transcribirse genes corregulados. Por ejemplo, los genes de inmunoglobulina de diferentes cromosomas se colocalizan en la misma fábrica de transcripción en linfocitos que producen grandes cantidades de anticuerpos. Así pues, las fábricas de transcripción no sólo pueden incrementar la eficacia de la expresión génica, sino que además facilitan la regulación coordinada de genes relacionados.

Cuerpos nucleares

El núcleo contiene varios orgánulos diferenciados, denominados **cuerpos nucleares**. Al igual que los orgánulos citoplásmicos (p. ej., mitocondrias), los cuerpos nucleares compartimentan el núcleo y sirven para concentrar proteínas y ARN que funcionan en determinados procesos del núcleo. Sin embargo, a diferencia de los orgánulos citoplásmicos, los cuerpos nucleares no están rodeados de membrana, sino que se mantienen gracias a las interacciones entre proteínas y entre proteínas y ARN. Como resultado, los cuerpos nucleares son estructuras dinámicas capaces de intercambiar su contenido con el resto del núcleo.

El cuerpo nuclear más notorio es el nucléolo (véase Fig. 10.1) que, como describe la siguiente sección del capítulo, se dedica a la síntesis de ARNr y producción de ribosomas. Otros cuerpos nucleares distintos participan en el procesamiento del ARN, ensamblaje de los complejos de ribonucleoproteínas, y regulación de la expresión génica (**Tabla 10.2**). A continuación se exponen el nucléolo y ejemplos de otros tres cuerpos nucleares que actúan en la regulación de la expresión génica y en el ensamblaje, la maduración y el almacenamiento de los componentes de la maquinaria de *splicing* de pre-ARNm. Sin embargo, las funciones de estos y otros muchos cuerpos nucleares todavía no se comprenden totalmente, con lo cual la determinación de este aspecto de la estructura y la función del núcleo se mantiene como un campo activo de investigación.

TABLA 10.2 Cuerpos nucleares

Cuerpo nuclear	Número por núcleo	Función
Nucléolo	1-4	Transcripción ARNr, procesamiento y ensamblaje ribosómico
Cuerpo de Cajal	0-10	Unión de RNPsn
Clastosoma	0-3	Proteólisis proteasómica
Histonas del cuerpo central	2-4	Transcripción y procesamiento de los pre-ARNm de las histonas
Motas	20-50	Almacenaje de factores de *splicing* del pre-ARNm
Cuerpo PML	10-30	Regulación transcripcional, reparación del ADN
Cuerpo Polycomb	10-20	Silenciamiento de genes

El nucléolo y el ARNr

El **nucléolo** es el sitio donde tiene lugar la transcripción y el procesamiento del ARNr, y el ensamblaje de los ribosomas. Como se explicó en el capítulo anterior, las células necesitan una gran cantidad de ribosomas para satisfacer la necesidad de síntesis de proteínas. Por ejemplo, las células de mamífero en continuo crecimiento contienen entre 5 y 10 millones de ribosomas, que deben sintetizarse cada vez que la célula se divide. El nucléolo es una fábrica de producción de ribosomas, diseñada para cubrir las necesidades de producción a gran escala de los ARNr y de ensamblaje de las subunidades ribosómicas. Los ribosomas eucariotas contienen cuatro tipos de ARN, denominados 5S, 5,8S, 18S y 28S (véase Fig. 9.4). Los ARNr 5,8S, 18S y 28S son transcritos como una única unidad en el nucléolo por la ARN polimerasa I, dando lugar a un ARN precursor ribosómico 45S (véase Fig. 8.12). Este pre-ARNr 45S es procesado y da lugar al ARN 18S de la subunidad ribosómica 40S (pequeña) y a los ARNr 5,8S y 28S de la subunidad ribosómica 60S (grande). El ARNr 5S, que también forma parte de la subunidad ribosómica 60S, se transcribe fuera del nucléolo por la ARN polimerasa III.

Las células contienen múltiples copias de los genes de ARNr para poder satisfacer la demanda de transcripción de un elevado número de moléculas de ARNr. El genoma humano, por ejemplo, contiene aproximadamente unas 200 copias del gen que codifica para los ARNr 5,8S, 18S y 28S, y aproximadamente 2.000 copias del gen que codifica para el ARNr 5S. Los genes del ARNr 5,8S, 18S y 28S se disponen en tándem en cinco cromosomas humanos diferentes (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22); los genes para el ARNr 5S se localizan en una única secuencia en tándem en el cromosoma 1.

El nucléolo se organiza en torno a las regiones cromosómicas que contienen los genes para los ARN 5,8S, 18S y 28S, que se denominan, por tanto, **regiones de organización nucleolar**. La formación de nucléolos después de la división celular exige la transcripción del pre-ARNr 45S, que parece llevar a la fusión de pequeños cuerpos prenucleolares que contienen factores de procesamiento y otros componentes del nucléolo. En la mayoría de las células, los nucléolos inicialmente separados se fusionan para formar un único nucléolo. Morfológicamente, los nucléolos consisten en tres regiones: el centro fibrilar, el componente fibrilar denso y el componente granular (**Fig. 10.24**). Estas diferentes regiones representan los sitios de fases progresivas de transcripción del ARNr, el procesamiento y el ensamblaje de ribosomas.

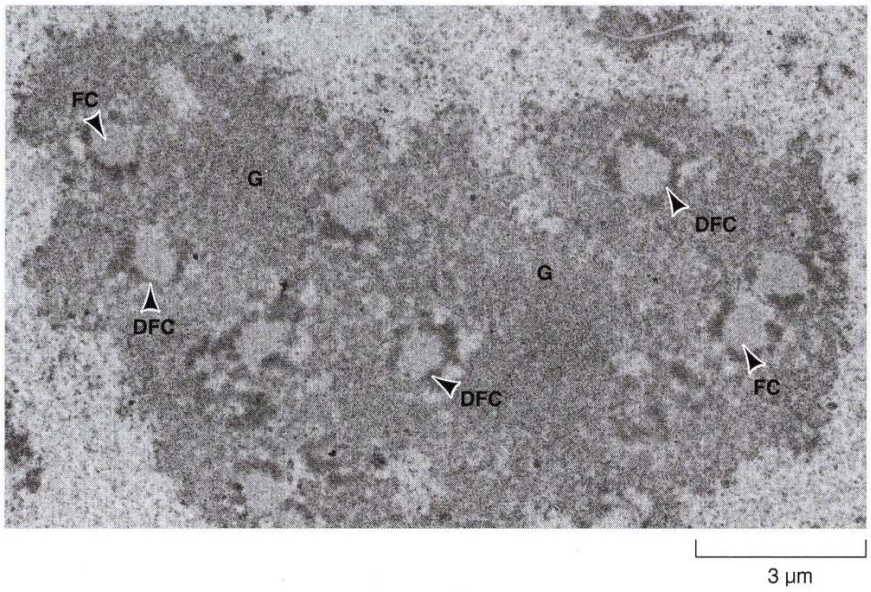


FIGURA 10.24 Estructura del nucléolo. En la micrografía electrónica se ilustra el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (G) del nucléolo. (Cortesía de David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

Los genes que codifican el ARNr están situados en el centro fibrilar y se transcriben en la interfaz con el componente fibrilar denso, donde se procesa el pre-ARNr. A continuación tiene lugar el ensamblaje de las subunidades ribosómicas en el componente granular. El tamaño del nucléolo depende de la actividad metabólica de la célula, con grandes nucléolos presentes en células que se acoplan de forma activa en la síntesis de proteínas. Esta variación se debe principalmente a diferencias en el tamaño del componente granular, lo que refleja los niveles de ensamblaje de ribosomas.

Cada región de organización nuclear contiene un grupo de genes de ARNr repetidos en tándem y que están separados entre sí por regiones de ADN que no se transcribe (**Fig. 10.25A**). Estos genes son transcritos activamente por la ARN polimerasa I, lo que permite que la transcripción se pue-

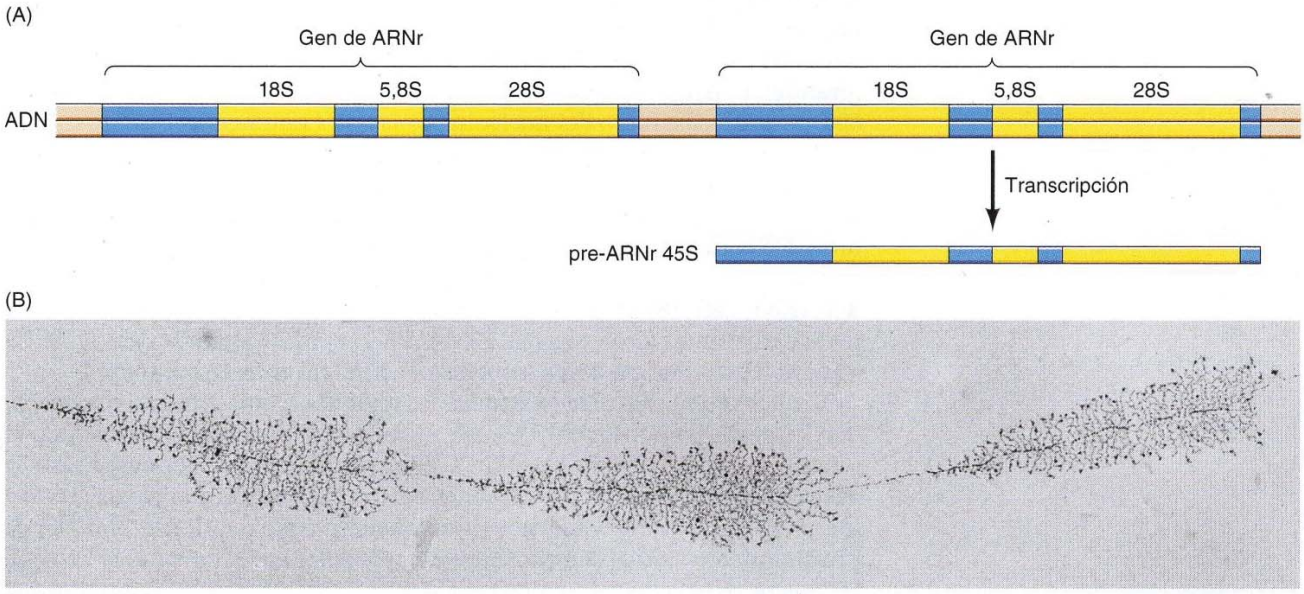


FIGURA 10.25 Genes de ARN ribosómico. (A) Cada gen de ARNr es una única unidad transcripcional que contiene los ARNr 18S, 5,8S y 28S y secuencias espaciadoras que también se transcriben. Los genes de ARNr se disponen en tándem, separados por un ADN espaciador que no se transcribe. (B) Un micrográfico de electrones muestra la transcripción de tres genes ARNr. Cada gen está rodeado por una serie de cadenas de ARN crecientes, causando un aspecto parecido a un árbol. (Cortesía de O. L. Miller Jr.)

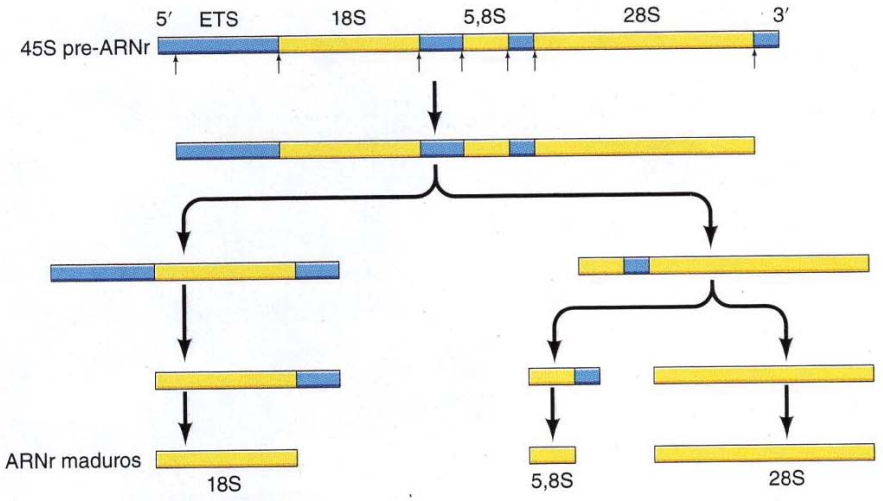


FIGURA 10.26 Procesamiento de pre-ARNr. El transcrito de pre-ARNr 45S de eucariotas superiores se procesa a través de una serie de escisiones para producir las especies de ARNr maduras 18S, 5,8S y 28S.

da visualizar fácilmente por microscopia electrónica. En las micrografías electrónicas, cada uno de los genes de ARNr colocados en tándem se encuentra rodeado de cadenas de ARN en crecimiento densamente empaquetadas, dando lugar a una estructura en forma de «árbol de navidad» (**Fig. 10.25B**). La alta densidad de las cadenas de ARN en crecimiento es debida a la gran cantidad de moléculas de ARN polimerasa, presentes en una densidad máxima de, aproximadamente, una polimerasa por cada cien pares de bases del ADN molde.

El transcrito primario de los genes de ARNr es el pre-ARNr 45S de gran tamaño y se procesa a través de una serie de escisiones para producir ARNr 18S, 5,8S y 28S (**Fig. 10.26**). Además de las escisiones, el procesamiento del pre-ARNr implica importantes modificaciones en las nitrogenadas, debido a la adición de grupos metilo a residuos de ribosa, y por la conversión de uridina en pseudouridina (véase Fig. 8.43). En las células animales, el procesamiento del pre-ARNr consiste en la metilación de unos 100 residuos de ribosa y la formación de 100 seudouridinas, aproximadamente. La mayoría de estas modificaciones ocurre durante o inmediatamente después de la síntesis del pre-ARNr, aunque algunas tienen lugar en etapas posteriores del procesamiento del pre-ARNr.

El procesamiento del pre-ARNr requiere la intervención de proteínas y ARN localizados en el nucléolo. Los nucléolos contienen más de 300 proteínas y aproximadamente 200 **ARN nucleolares pequeños (ARNsno)** que intervienen en el procesamiento del pre-ARNr. Al igual que los ARNsn, implicados en el procesamiento de pre-ARNm (como se expone en el Capítulo 8), los ARNsno están unidos a proteínas, formando RNPsno. Cada RNPsno está constituida por un único ARNsno asociado a ocho o diez proteínas. Las RNPsno se unen al pre-ARNr para formar un complejo de procesamiento de manera análoga a como se forman los espliceosomas en el pre-ARNm.

La acción de los ARNsno difiere de la de los ARNsn en que catalizan el *splicing* de ARNm (expuesto en el Capítulo 8). En cambio, los ARNsno actúan como ARN guía para dirigir las enzimas de proteínas a los lugares de modificaciones específicas de moléculas de pre-ARNr. Existen dos familias de ARNsno que se asocian con proteínas diferentes y catalizan la metilación de ribosa o la formación de pseudouridina (**Fig. 10.27**). Los ARNsno contienen

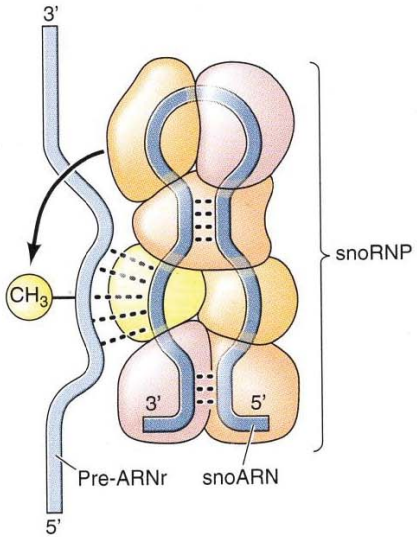


FIGURA 10.27 Papel de los ARNsno en la modificación de bases de pre-ARNr. Los ARNsno contienen secuencias cortas complementarias al ARNr. El apareamiento de bases entre ARNsno y pre-ARNr dirige las enzimas que catalizan la modificación de ARNr (p. ej., metilación) a los lugares apropiados.

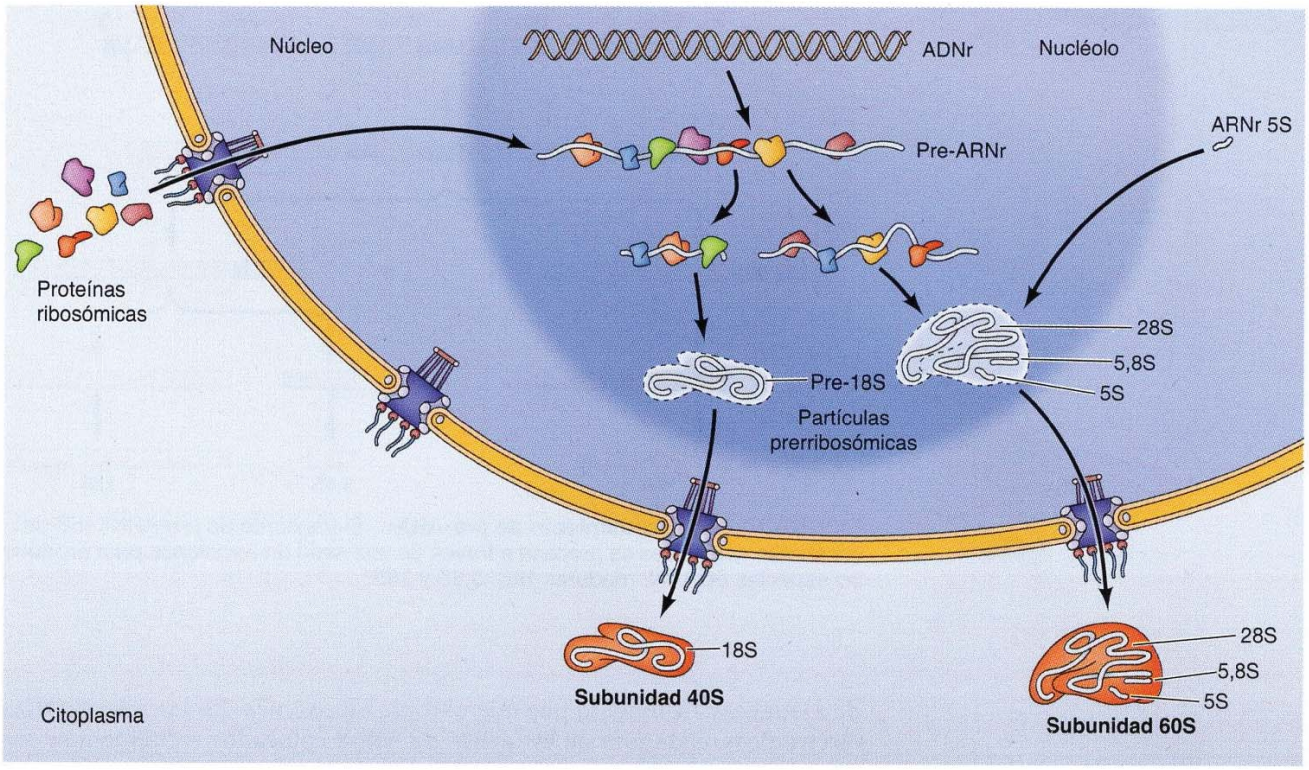


FIGURA 10.28 Ensamblaje de los ribosomas. Las proteínas ribosómicas se transportan al nucléolo desde el citoplasma y comienzan a ensamblarse con el pre-ARNr antes de su procesamiento. Al mismo tiempo que se procesa el pre-ARNr, proteínas ribosómicas adicionales y el ARNr 5S (que es sintetizado fuera del nucléolo) se ensamblan para formar partículas prerribosómicas. Las etapas finales de la maduración continúan con la salida de las partículas prerribosómicas al citoplasma, originando las subunidades ribosómicas 40S y 60S.

secuencias cortas de aproximadamente 15 nucleótidos que son complementarias al ARNr 18S o 28S. Es importante indicar que estas regiones de complementariedad incluyen los sitios de modificación de bases en el ARNr. Mediante apareamiento de bases con regiones específicas del pre-ARNr, los ARNsno actúan para dirigir las proteínas responsables de la metilación o la pseudouridilación al lugar correcto de la molécula de pre-ARNr.

La formación de los ribosomas implica el ensamblaje del ARN ribosómico precursor con las proteínas ribosómicas y con el ARNr 5S (**Fig. 10.28**). Los genes que codifican para las proteínas ribosómicas se transcriben fuera del nucléolo por la ARN polimerasa II, originando ARNm que son traducidos en los ribosomas citoplasmáticos. Las proteínas ribosómicas se transportan posteriormente desde el citoplasma al nucléolo, donde se ensamblan con los ARNr para formar partículas prerribosómicas. Aunque los genes para el ARNr 5S también se transcriben fuera del nucléolo, en este caso por la ARN polimerasa III, se ensamblan igualmente en el interior del nucléolo para formar las partículas prerribosómicas. Las etapas finales de la maduración de las subunidades ribosómicas siguen a la salida de las partículas prerribosómicas al citoplasma, formando las subunidades ribosómicas eucariotas 40S y 60S.

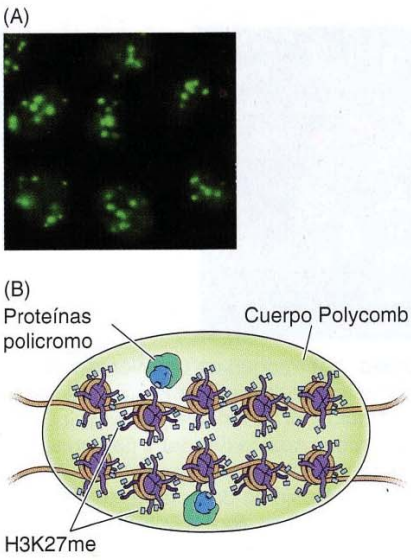


FIGURA 10.29 Cuerpos Polycomb. (A) Núcleos de células humanas que expresan una proteína Polycomb marcada con GFP. (B) Los cuerpos Polycomb contienen grupos de genes reprimidos modificados por metilación de histona H3 lisina 27 (H3K27me). (A, de V. Pirrotta y H.-B. Li, 2012. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 101).

Cuerpos Polycomb: centros de represión transcripcional

Como se expuso en el Capítulo 8, las proteínas Polycomb son responsables de la represión transcripcional de diversos genes por medio de la metilación de residuos de histona H3 lisina 27. Las proteínas Polycomb consisten en dos complejos: uno se une a residuos metilados de H3 lisina 27 y el otro es una enzima que metila residuos adyacentes de H3 lisina 27. Como consecuencia, la metilación de H3 lisina 27 puede extenderse a nucleosomas adyacentes para generar dominios de cromatina reprimida (véase Fig. 8.36). El análisis de la localización nuclear de proteínas Polycomb por inmunofluorescencia indica que se concentran en un número relativamente pequeño de dominios, llamados **cuerpos Polycomb**, en lugar de distribuirse por el núcleo (**Fig. 10.29A**).

Los cuerpos Polycomb se asocian frecuentemente con la heterocromatina, en consonancia con su papel en la represión génica. En algunos casos, los cuerpos pueden formarse como resultado de represión Polycomb de una serie de genes adyacentes. Sin embargo, algunos cuerpos Polycomb contienen grupos de dominios reprimidos de diferentes regiones cromosómicas (**Fig. 10.29B**). Así, de forma análoga a las fábricas de transcripción (véase Fig. 10.23), los cuerpos Polycomb son lugares agrupados de genes reprimidos de forma coordinada.

Cuerpos de Cajal y motas: procesamiento y almacenamiento de RNPsn

Los cuerpos de Cajal y las motas desempeñan papeles importantes en el ensamblaje y el almacenamiento de RNPsn que son responsables del *splicing* de pre-ARNm. Los cuerpos de Cajal, descritos por primera vez por Ramón y Cajal en 1906, son pequeños cuerpos nucleares que intervienen en el ensamblaje de RNPsn y otros complejos de ARN-proteínas. Como se expuso antes en este capítulo, los ARNsn se exportan primero al citoplasma, donde se asocian con proteínas para formar RNPsn que regresan al núcleo (véase Fig. 10.14). Los RNPsn se concentran entonces en los cuerpos de Cajal, donde tienen lugar las fases finales de la maduración de RNPsn. Esto incluye la modificación de los ARNsn por metilación de ribosas y pseudouridilación, de forma similar a las modificaciones de pre-ARN que tienen lugar en el nucléolo. En consonancia con el procesamiento de ARNsn en los cuerpos de

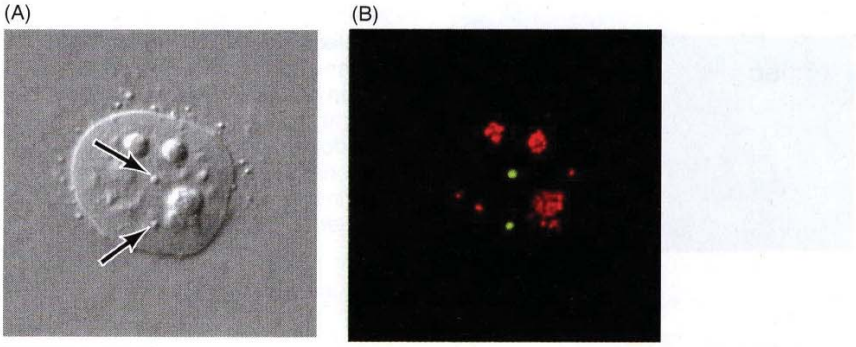


FIGURA 10.30 Cuerpos de Cajal en el núcleo. (A) Imagen de un microscopio de contraste por interferencia diferencial del núcleo de una célula HeLa. Las flechas indican los dos cuerpos de Cajal. (B) Tinción inmunofluorescente del mismo núcleo con anticuerpos frente a las proteínas coilina (verde) y fibrilarina (rojo). La fibrilarina está presente tanto en las zonas fibrilares densas de los nucléolos, como en los cuerpos de Cajal. La coilina sólo es detectable en los cuerpos de Cajal. (De J. G. Gall, 2000. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:273.)

Cajal, la enzima responsable de metilación de ARN (fibrilarina) se concentra en los cuerpos de Cajal y en los nucléolos (**Fig. 10.30**). Además, los cuerpos de Cajal contienen ARN específicos de cuerpos de Cajal pequeños (ARNsca). Los ARNsca están relacionados con los ARNsno de los nucléolos y, de forma similar, actúan como ARN guía para dirigir la metilación de las ribosas y la pseudouridilación de los ARNsn en cuerpos de Cajal.

Además de su papel en el ensamblaje de RNPsn, los cuerpos de Cajal parecen desempeñar un papel en el ensamblaje de la telomerasa, que es esencial para la replicación de los extremos del ADN cromosómico. Tal como se indicó en el Capítulo 7, la telomerasa es un complejo entre un ARN que reconoce las secuencias en los extremos de los cromosomas (telómeros) y una transcriptasa inversa que utiliza la ARN telomerasa como molde para copiar dichas secuencias terminales (véase Fig. 7.16). Los cuerpos de Cajal pueden promover el ensamblaje del complejo ARN-proteína telomerasa, así como facilitar su suministro a los telómeros.

Después del ensamblaje y la maduración en cuerpos de Cajal, los RNPsn se transfieren a **motas**, que son cuerpos nucleares discretos que contienen componentes de la maquinaria de *splicing* del ARNm (**Fig. 10.31**). Los factores del *splicing*, así como los RNPsn, están concentrados en motas en lugar de distribuirse de manera uniforme a lo largo del núcleo. Según se cree, las motas son dominios de almacenamiento de componentes de *splicing*, que después son reclutados en genes transcritos activamente donde tiene lugar el procesamiento de pre-ARNm.

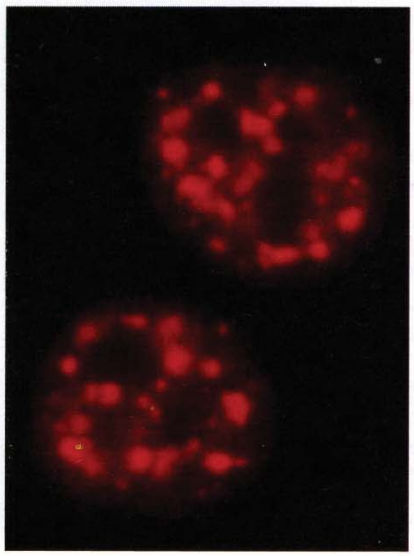


FIGURA 10.31 Motas nucleares. El marcaje mediante anticuerpos inmunofluorescentes indica que los factores responsables del *splicing* se concentran en dominios discretos dentro del núcleo, denominados motas nucleares. (Cortesía de David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

RESUMEN

Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma

Estructura de la envuelta nuclear: La envuelta nuclear separa el contenido del núcleo y del citoplasma, manteniendo el núcleo como un compartimento bioquímico diferenciado que alberga el material genético y sirve como lugar de transcripción y procesamiento del ARN en las células eucariotas. La envuelta nuclear está formada por una membrana nuclear interna y externa, unidas a nivel de los complejos del poro nuclear, y por una lámina nuclear subyacente.

envuelta nuclear, membrana nuclear, lámina nuclear, lámina

Complejo del poro nuclear: Los complejos del poro nuclear son estructuras grandes y son las únicas vías a través de las cuales las moléculas pueden viajar entre el núcleo y el citoplasma. Las moléculas pequeñas se difunden libremente a través de los canales abiertos del complejo del poro nuclear. Las macromoléculas se transportan selectivamente del núcleo al citoplasma o del citoplasma al núcleo.

complejo del poro nuclear

Ver Vídeo 10.1

Transporte selectivo de proteínas desde y hacia el núcleo: Las proteínas que van a ser transportadas al núcleo contienen señales de localización nuclear que son reconocidas por receptores que dirigen el transporte a través del complejo del poro nuclear. Las proteínas que se desplazan continuamente entre el núcleo y el citoplasma tienen señales de exportación nuclear que las etiquetan para que sean transportadas desde el núcleo al citoplasma. La pequeña proteína Ran, que une GTP, se necesita para la translocación a través del complejo del poro nuclear y determina la dirección del transporte.

señal de localización nuclear, receptor de transporte nuclear, importina, Ran, señal de exportación nuclear, exportina, carioferina

Ver Animación 10.1 y Vídeo 10.2

Transporte de ARN: Los ARN se transportan a través del complejo del poro nuclear en forma de complejos ribonucleoproteínicos. Los ARN mensajeros, los ARN ribosómicos y los ARN de transferencia son exportados desde el núcleo para participar en la síntesis de proteínas. Los ARN nucleares pequeños son transportados inicialmente desde el núcleo al citoplasma, donde se asocian con proteínas para formar las RNP, y éstas regresan al núcleo.

Regulación del transporte de proteínas al núcleo: La actividad de ciertas proteínas, como los factores de transcripción, está controlada por la regulación tanto de su entrada como de su salida desde el núcleo.

Organización de cromosomas

Territorios cromosómicos: Los cromosomas individuales ocupan distintos territorios dentro del núcleo y se dividen en grandes dominios en bucle que actúan como unidades independientes.

Localización de cromatinas y actividad transcripcional: La heterocromatina transcripcionalmente inactiva se asocia frecuentemente con la envuelta nuclear o el nucléolo, mientras que la cromatina transcripcionalmente activa está situada en el interior del núcleo.

eucromatina, heterocromatina, dominio asociado a laminina (LAD), dominio asociado a nucléolo (NAD)

Fábricas de replicación y transcripción: La replicación de ADN tiene lugar dentro de grandes complejos que contienen múltiples horquillas de replicación. La transcripción se produce también en lugares agrupados que están enriquecidos en ARN polimerasas y factores de transcripción.

fábrica de replicación, fábrica de transcripción

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Cuerpos nucleares

El nucléolo y el ARNr: Varios tipos de cuerpos nucleares compartimentan el núcleo y sirven para concentrar proteínas y ARN que intervienen en diversos aspectos de la expresión génica. El nucléolo está asociado a los genes para los ARN ribosómicos y en él se producen la transcripción del ARNr, el procesamiento del ARNr y el ensamblaje de ribosomas. El procesamiento de pre-ARNr está mediado por ARN nucleolares pequeños (ARNsno).

Cuerpos Polycomb: centros de represión transcripcional: Las proteínas Polycomb, que reprimen diversos genes mediante metilación de las histonas, se concentran en grupos que reprimen múltiples dominios de cromatinas.

Cuerpos de Cajal y motas: procesamiento y almacenamiento de RNPsn: Los cuerpos de Cajal intervienen en la modificación de ARNsn y en el ensamblaje de RNPsn, así como en el ensamblaje de la telomerasa. Las motas nucleares son lugares de almacenamiento de RNPsn y otros componentes de la maquinaria de *splicing* de pre-ARNm.

PALABRAS CLAVE

cuerpo nuclear, nucléolo, región de organización nucleolar, ARN nucleolar pequeño (ARNsno)

cuerpo Polycomb

cuerpo de Cajal, mota

Preguntas

1. Separando la transcripción de la traducción, la envuelta nuclear permite a los eucariotas regular la expresión génica mediante procesos que no se encuentran en los procariotas. ¿Cuáles son estos procesos que son exclusivos de eucariotas?
2. ¿Qué dos papeles juegan las láminas en la estructura y función nuclear?
3. Si inyectas dos proteínas, una de 15 kDa y otra de 100 kDa, y las dos carecen de señales de transporte nuclear al interior de un óvulo de rana, ¿entrará alguna en el núcleo?
4. ¿Qué dirige la direccionalidad del importe nuclear?
5. Describe cómo la actividad de un factor de transcripción regulador de un gen puede ser regulada por el importe nuclear.
6. Estás estudiando un factor de transcripción regulado por la fosforilación de residuos de serina, lo que inactiva la señal de localización nuclear. ¿Cómo afectaría la sustitución de residuos de serina por alanina a la localización subcelular del factor de transcripción y a la expresión de su gen diana?
7. ¿Cómo afectaría una mutación en la señal de exportación nuclear de una proteína que viaja continuamente entre el núcleo y el citoplasma a su distribución subcelular?
8. La replicación del ADN parece tener lugar en unas 200 localizaciones específicas o fábricas de replicación. ¿Cómo localizarías estos dominios en células de mamífero en cultivo?
9. ¿Cómo demostraron Smith y sus colaboradores que la secuencia de aminoácidos 126 a 132 del antígeno T era suficiente para la acumulación nuclear de la proteína?
10. ¿Cuál es el significado del moteado nuclear?
11. ¿Cuál es la función de los ARNsno?
12. ¿Cómo afectaría el ARNi frente a la exportina-t humana a los fibroblastos humanos en cultivo?

Bibliografía

Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma

Bank, E. M. and Y. Gruenbaum. 2011. The nuclear lamina and heterochromatin: a complex relationship. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1705–1709. [R]

Burke, B. and C. L. Stewart. 2013. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 13–24. [R]

Chook, Y. M. and K. E. Suel. 2011. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1813: 1593–1606. [R]

Gerace, L. and M. D. Huber. 2012. Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *J. Struc. Biol.* 177: 24–31. [R]

Grossman, E., O. Medalia and M. Zwerger. 2012. Functional architecture of the nuclear pore complex. *Ann. Rev. Biophys.* 41: 557–584. [R]

Grunwald, D., R. H. Singer, and M. Rout. 2011. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature* 475: 333–341. [R]

Guttler, T. and D. Gorlich. 2011. Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *EMBO J.* 30: 3457–3474. [R]

Kohler, A. and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 761–773. [R]

Matera, A. G., R. M. Terns and M. P. Terns. 2007. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 209–220. [R]

Simon, D. N. and K. L. Wilson. 2011. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks.' *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 695–708. [R]

Starr, D. A. and H. N. Fridolfsson. 2010. Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 26: 421–444. [R]

Stewart, M. 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 195–208. [R]

Stewart, M. 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 35: 609–617. [R]

Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel and M. P. Rout. 2010. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 490–500. [R]

Walde, S. and R. H. Kehlenback. 2010. The Part and the Whole: functions of nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Trends Cell Biol.* 20: 461–469. [R]

Organización interna del núcleo

Amendola, M. and B. van Steensel. 2014. Mechanisms and dynamics of nuclear lamina-genome interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28: 61–68. [R]

Bickmore, W. A. 2013. The spatial organization of the human genome. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14: 67–84. [R]

Bickmore, W. A. and B. van Steensel. 2013. Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell* 152: 1270–1284. [R]

Buckley, M. S. and J. T. Lis. 2014. Imaging RNA polymerase II transcription sites in living cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 25: 126–130. [R]

Cremer, T. and M. Cremer. 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a003889. [R]

Edelman, L. B. and P. Fraser. 2012. Transcription factories: genetic programming in three dimensions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 110–114. [R]

Mekhail, K. and D. Moazed. 2010. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 317–328. [R].

Padeken, J. and P. Heun. 2014. Nucleolus and nuclear periphery: velcro for heterochromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28: 54–60. [R]

Misteli, T. 2013. The cell biology of genomes: bringing the double helix to life. *Cell* 152: 1209–1212. [R]

Park, S.-K., Y. Xiang, X. Feng and W. T. Garrard. 2014. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 28: 1159–164. [P]

Sexton, T. and G. Cavalli. 2015. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell* 160: 1049–1059. [R]

Van Bortle, K. and V. G. Corces. 2012. Nuclear organization and genome function. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 163–187. [R]172–179. [R]

Cuerpos nucleares

Bernardi, R. and P. P. Pandolfi. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 1006–1016. [R]

Bratkovic, T. and B. Rogelj. 2014. The many faces of small nucleolar RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 1839: 438–443. [R]

Dundr, M. 2012. Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24: 415–422. [R]

Mao, Y. S., B. Zhang and D. L. Spector. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27: 295–306. [R]

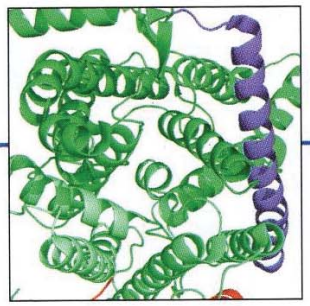
Nizami, Z., S. Deryusheva and J. G. Gall. 2010. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2:a000653. [R]

Pederson, T. 2011. The nucleolus. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a000638. [R]

Pirrotta, V. and H.-B. Li. 2012. A view of nuclear Polycomb bodies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 101–109. [R]

Sleeman, J. E. and L. Trinkle-Mulcahy. 2014. Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28: 76–83. [R]

Spector, D. L. and A. I. Lamond. 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a000646. [R]



Capítulo 11

Distribución y transporte de proteínas
Retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas

Retículo endoplásmico 397

Aparato de Golgi 421

Mecanismo de transporte de las vesículas 430

Lisosomas 436

EXPERIMENTO CLAVE
Hipótesis de la señal 402

MEDICINA MOLECULAR
Enfermedad de Gaucher 437

Además de por la presencia de un núcleo, las células eucariotas se distinguen de las células procariotas por la presencia en el citoplasma de orgánulos rodeados de membrana. Estos orgánulos proporcionan compartimentos diferenciados en los que tienen lugar actividades celulares específicas, y la subdivisión resultante del citoplasma permite a las células eucariotas funcionar eficientemente a pesar de su gran tamaño (aproximadamente 1.000 veces el volumen de las bacterias).

Debido a la compleja organización interna de las células eucariotas, distribuir y dirigir a las proteínas hacia sus destinos adecuados son tareas considerables. El primer paso en la distribución de las proteínas tiene lugar mientras aún está en marcha la traducción. Las proteínas destinadas al retículo endoplásmico, al aparato de Golgi, a los lisosomas, a la membrana plasmática y a ser secretadas se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico. A medida que la traducción continúa, las cadenas polipeptídicas se transportan al interior del retículo endoplásmico, donde tiene lugar el plegamiento y procesamiento de las proteínas. Desde el retículo endoplásmico, las proteínas se transportan en vesículas al aparato de Golgi, donde son nuevamente procesadas y distribuidas para el transporte a los lisosomas, a la membrana plasmática o a ser secretadas desde la célula. Algunos de estos orgánulos, además de los endosomas, participan en la organización y el transporte de proteínas que son internalizadas desde el exterior celular (véase Cap. 14). El retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas se diferencian de esta manera de otros orgánulos citoplásmicos en que intervienen conjuntamente en el procesamiento de las proteínas y en que están conectados mediante vesículas de transporte. Cerca de la tercera parte de las proteínas celulares son procesadas en el retículo endoplásmico, hecho que resalta la importancia de esta vía en la fisiología celular.

Retículo endoplásmico

El **retículo endoplásmico (ER)** es una red de túbulos y sacos (cisternas) rodeados de membrana que se extiende desde la membrana nuclear por todo el citoplasma (**Fig. 11.1**). Todo el retículo endoplásmico está rodeado por una membrana continua y es el orgánulo más grande de la mayoría de las células eucariotas. Su membrana puede representar aproximadamente la mitad de todas las membranas de la célula, y el espacio encerrado por el RE (la luz, o espacio de las cisternas) puede representar alrededor del 10% de todo el volu-

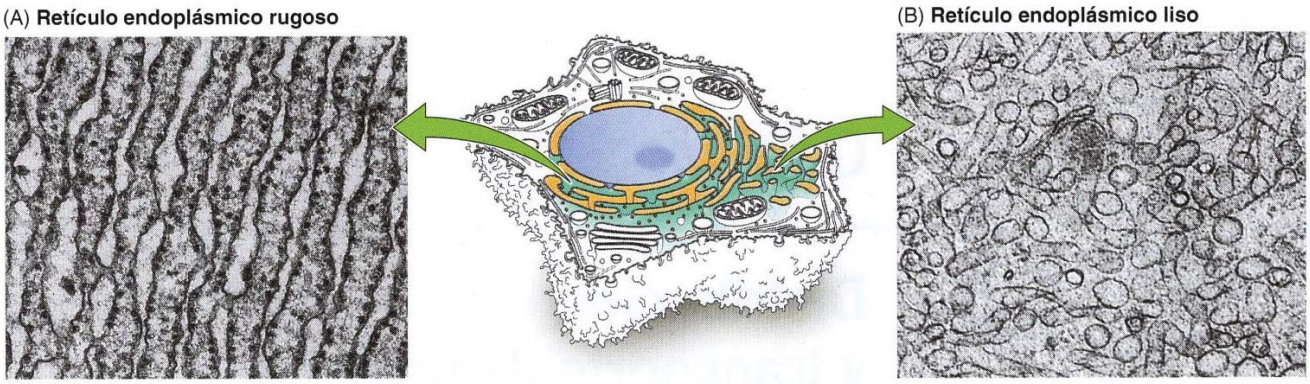


FIGURA 11.1 Retículo endoplásmico (RE). (A) Microfotografía electrónica del RE rugoso en células de hígado de rata. Los ribosomas están unidos a la cara citosólica de la membrana del RE. (B) Microfotografía electrónica del RE liso en las células de Leydig del testículo, que participan activamente en la síntesis de hormonas esteroideas.

men celular. Como se trató previamente, hay tipos distintos de RE que realizan funciones diferentes en la célula. El **RE rugoso**, que está cubierto por ribosomas en su superficie (citosólica) externa, funcionan ambos en el procesamiento de las proteínas. El **RE liso** no está asociado con los ribosomas y está implicado en el metabolismo de los lípidos, en lugar de en el de las proteínas.

Retículo endoplásmico y secreción de proteínas

El papel del retículo endoplásmico en el procesamiento y distribución de las proteínas fue demostrado por primera vez por George Palade y sus colaboradores en los años 60 (**Fig. 11.2**). Estos investigadores estudiaron el destino de las proteínas recién sintetizadas en unas células especializadas del páncreas (células pancreáticas acinares) que secretan enzimas digestivas al intestino delgado. Debido a que la mayoría de las proteínas sintetizadas por estas células son secretadas, Palade y colaboradores fueron capaces de estudiar la ruta tomada por las proteínas secretadas simplemente mediante el marcaje con aminoácidos radiactivos de las proteínas recién sintetizadas

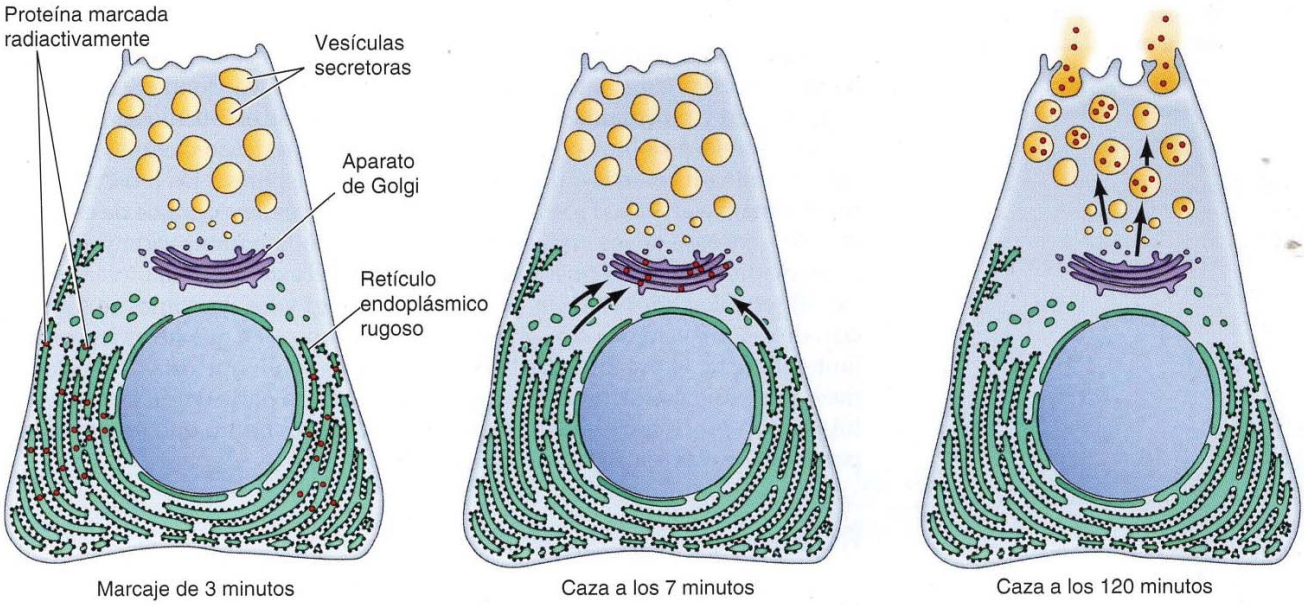


FIGURA 11.2 Vía secretora. Las células acinares pancreáticas, que secretan la mayor parte de sus proteínas sintetizadas de novo en el tracto digestivo, se marcaron con aminoácidos radiactivos para estudiar la vía intracelular utilizada por las proteínas secretadas. Tras 3 minutos de incubación con aminoácidos radioactivos (un «pulso»), la autorradiografía reveló que las proteínas recién sintetizadas estaban situadas en el RE rugoso. Tras una incubación posterior con aminoácidos no radiactivos (caza), se observó que las proteínas se habían desplazado desde el RE al aparato de Golgi y después, en el interior de vesículas de secreción, a la membrana plasmática y al exterior de la célula.

VÍDEO 11.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v11.1

Transporte a través de la vía secretora. Las proteínas son transportadas desde el RE al aparato de Golgi y desde éste a la membrana plasmática.

con aminoácidos radioactivos en una técnica conocida como experimento de «pulso-caza». La localización en la célula de las proteínas marcadas radiactivamente se determinó a continuación mediante una autorradiografía, poniendo de manifiesto los lugares celulares implicados en los procesos que conducen a la secreción de las proteínas. Después de una breve exposición de las células acinares pancreáticas a los aminoácidos radiactivos (un «pulso»), se detectaron proteínas sintetizadas *de novo* en el RE rugoso, por lo que se le identificó como el lugar de síntesis de las proteínas destinadas a la secreción. Si a continuación las células se incubaban durante un corto período de tiempo en un medio que contenía aminoácidos no radiactivos (proceso conocido como *caza*), las proteínas marcadas radiactivamente se detectaban en el aparato de Golgi. Tras períodos de caza más largos, las proteínas marcadas radiactivamente migraban desde el aparato de Golgi a la superficie celular en **vesículas de secreción**, que posteriormente se fusionaban con la membrana plasmática para liberar su contenido fuera de la célula.

Estos experimentos definieron una vía tomada por las proteínas secretadas, la **vía secretora:** RE rugoso → Golgi → vesículas de secreción-exterior de la célula. Estudios adicionales ampliaron estos resultados y demostraron que esta vía no está restringida a las proteínas destinadas a ser secretadas. Partes de ella se comparten con proteínas destinadas para otros compartimentos. Las proteínas de la membrana plasmática y las lisosómicas también migran desde el RE rugoso hasta el Golgi y posteriormente a sus destinos finales. Otras proteínas pasan por las etapas iniciales de la vía secretora pero posteriormente son retenidas y su actividad tiene lugar en el RE o en el aparato de Golgi.

Por tanto, la entrada de las proteínas en el RE representa un cruce de caminos muy importante en el tráfico de proteínas en las células eucariotas (**Fig. 11.3**). Las proteínas destinadas a ser secretadas o a incorporarse en el RE, aparato de Golgi, lisosomas, o membrana plasmática son dirigidas inicialmente al RE, al igual que las proteínas de la envuelta nuclear y la mem-

◆ El retículo endoplásmico también juega un papel clave en la transducción de la señal actuando como uno de los depósitos principales de calcio intracelular. La liberación de calcio desde el RE en respuesta a las señales apropiadas altera la actividad de las proteínas citosólicas clave y juega un papel muy importante en la contracción muscular (véanse Caps. 13 y 16).

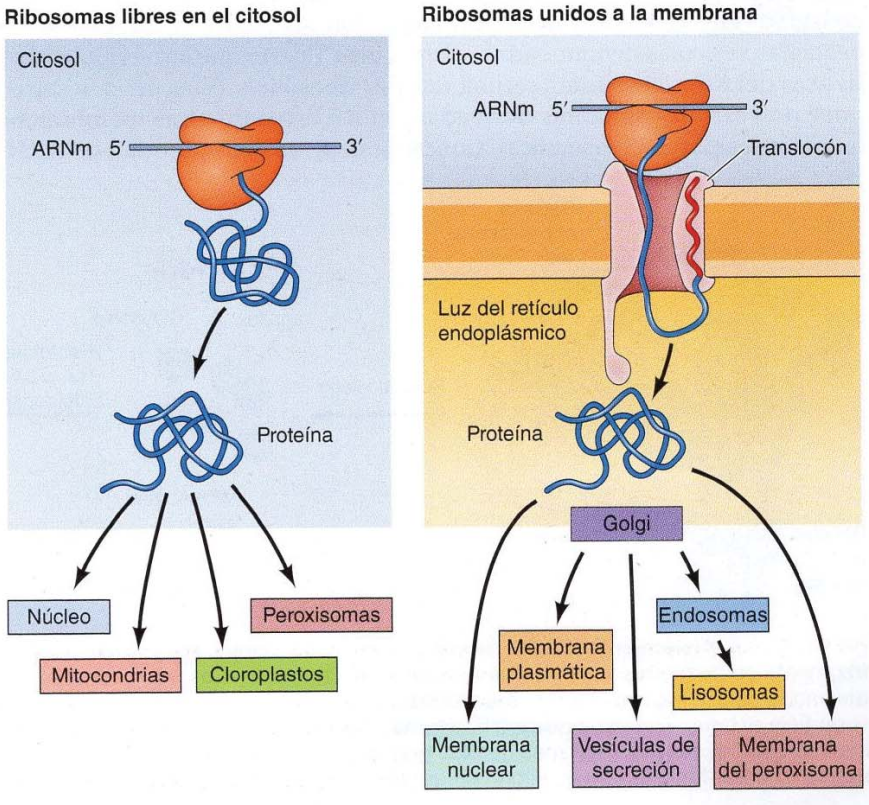


FIGURA 11.3 Esquema general de la distribución de las proteínas. En las células de los mamíferos, la distribución inicial de las proteínas al RE se produce mientras tiene lugar la traducción. Las proteínas sintetizadas en los ribosomas libres permanecen en el citosol o son transportadas al núcleo, mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas. Por el contrario, las proteínas sintetizadas en los ribosomas unidos a la membrana se traslocan directamente al interior del RE a través del translocón. Estas proteínas contienen una secuencia señal (indicada en rojo), que se escinde durante la translocación. Las proteínas trasladadas al RE pueden quedar retenidas dentro de este o bien ser transportadas a las membranas del núcleo o los peroxisomas, o al aparato de Golgi y, desde este, a los endosomas, lisosomas, la membrana plasmática, o al exterior de la célula a través de vesículas secretoras.

brana peroxisómica. En las células de los mamíferos, la mayoría de las proteínas son transferidas al RE mientras están siendo traducidas por los ribosomas unidos a la membrana. Por el contrario, las proteínas destinadas a permanecer en el citosol o a incorporarse a las mitocondrias, los cloroplastos, o al interior del núcleo o de los peroxisomas se sintetizan en ribosomas libres y se liberan al citoplasma una vez completada su traducción.

Marcaje de las proteínas para dirigirse al retículo endoplásmico

Las proteínas pueden ser translocadas al RE durante su síntesis en los ribosomas unidos a la membrana (translocación cotraduccional) o una vez que la traducción se ha completado en los ribosomas libres en el citosol (translocación postraduccional). En las células de los mamíferos, la mayoría de las proteínas entran en el RE de manera cotraduccional, mientras que en las levaduras se utilizan tanto la vía cotraduccional como la postraduccional. El primer paso en la vía cotraduccional es la asociación del complejo ribosoma-ARNm con el RE. La marca que determina que los ribosomas se unan con la membrana del RE es la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica que está siendo sintetizada, en vez de propiedades intrínsecas del propio ribosoma. Los ribosomas libres y los unidos a la membrana son funcionalmente indistinguibles, y toda la síntesis proteica se inicia en los ribosomas que están libres en el citosol. Los ribosomas implicados en la síntesis de proteínas destinadas a ser secretadas están marcados para dirigirse al retículo endoplásmico mediante una **secuencia señal** localizada en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Estas secuencias señal son pequeños segmentos de aminoácidos hidrófobos que son escindidos de la cadena polipeptídica durante su transferencia a la luz del RE.

El papel general de las secuencias señal para dirigir a las proteínas a sus localizaciones adecuadas en la célula se dilucidó por primera vez mediante estudios sobre la internalización de las proteínas de secreción en el RE. Estos experimentos utilizaron preparaciones *in vitro* de RE rugoso, que se aislaron de extractos celulares mediante centrifugación en un gradiente de densidad (**Fig. 11.4**). Cuando las células se rompen, el RE se fragmenta en pequeñas vesículas denominadas **microsomas**. Puesto que las vesículas derivadas del RE rugoso están recubiertas por ribosomas, éstas pueden separarse de vesículas similares derivadas del RE liso o de otras membranas (p. ej., la membrana plasmática). Concretamente, la gran cantidad de ARN

ANIMACIÓN 11.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a11.1

Dirección cotraduccional de proteínas de secreción al RE. En las células de mamífero, la principal vía de translocación de proteínas al RE es una vía cotraduccional que requiere la presencia de una secuencia señal en la proteína recién formada.

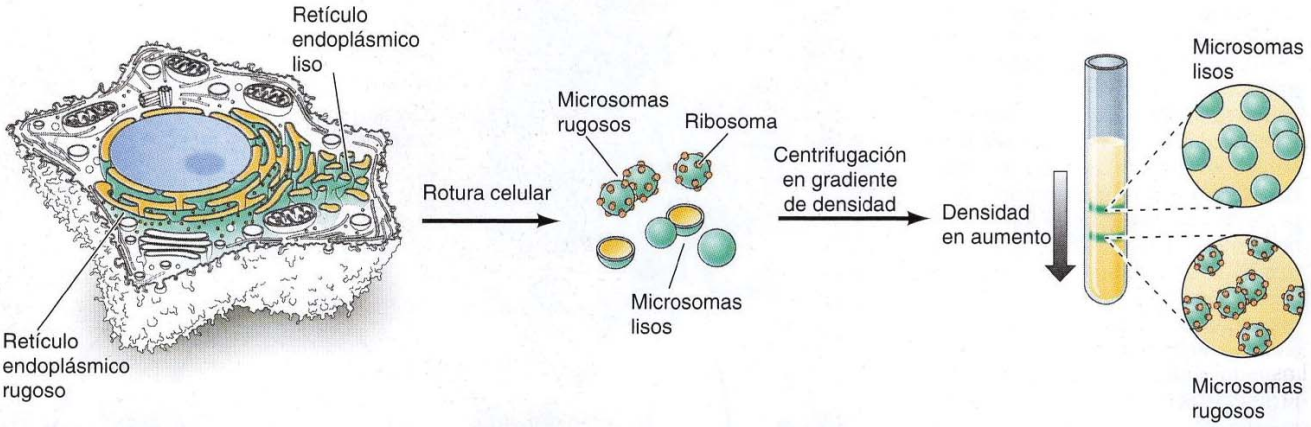


FIGURA 11.4 Aislamiento del RE rugoso. Cuando las células se rompen, el RE se fragmenta en pequeñas vesículas denominadas microsomas. Los microsomas derivados del RE rugoso (microsomas rugosos) están rodeados por ribosomas en su superficie externa. Debido a que los ribosomas contienen una gran cantidad de ARN, los microsomas rugosos son más densos que los microsomas lisos y se pueden aislar mediante centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad (véase Cap. 1).

existente en los ribosomas aumenta la densidad de las vesículas de membrana a las que están unidos, permitiendo la purificación de las vesículas derivadas del RE rugoso (microsomas rugosos) mediante centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad.

Günter Blobel y David Sabatini propusieron por primera vez en 1971 que la señal para la unión del ribosoma al RE era una secuencia de aminoácidos próxima al extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Esta hipótesis fue apoyada por los resultados de la traducción *in vitro* de ARNm que codifican proteínas secretadas, como las inmunoglobulinas (**Fig. 11.5**). Si un ARNm que codifica una proteína secretada era traducido *in vitro* por ribosomas libres, se observaba que la proteína producida era ligeramente mayor que la proteína normal secretada. Sin embargo, si se añadían microsomas al sistema la proteína traducida *in vitro* se incorporaba a los microsomas y se escindía en el tamaño adecuado. Estos experimentos condujeron a que se formulara de una manera más detallada la hipótesis de la señal, proponiendo que una secuencia guía amino-terminal marca y dirige la cadena polipeptídica a los microsomas y que es escindida posteriormente por una proteasa microsomal. Muchos hallazgos posteriores han sostenido este modelo, incluyendo experimentos con ADN recombinante que han demostrado que la adición de una secuencia señal a una proteína que normalmente no es secretada es suficiente para dirigir la incorporación de la proteína recombinante al RE rugoso.

El mecanismo por el que las proteínas secretadas son dirigidas al RE durante su traducción (vía cotraduccional) se conoce bien actualmente. Las secuencias señal contienen unos 15-40 aminoácidos, incluyendo una tira de

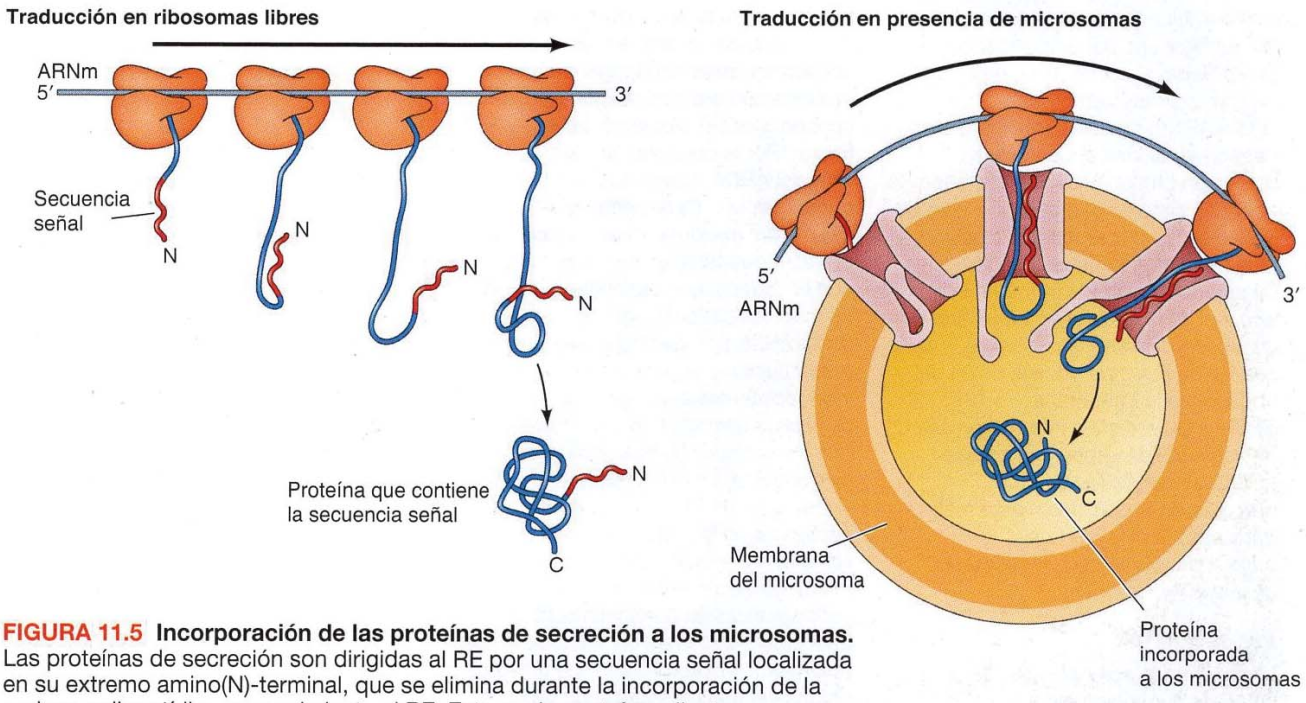
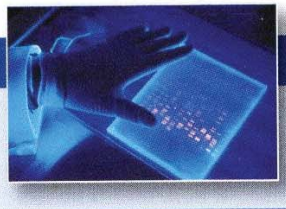


FIGURA 11.5 Incorporación de las proteínas de secreción a los microsomas. Las proteínas de secreción son dirigidas al RE por una secuencia señal localizada en su extremo amino(N)-terminal, que se elimina durante la incorporación de la cadena polipeptídica en crecimiento al RE. Esto se demostró mediante experimentos que mostraron que la traducción de los ARNm de una proteína de secreción en los ribosomas libres daba lugar a proteínas que mantenían su secuencia señal y que, por tanto, eran ligeramente más grandes que las proteínas de secreción normales. Sin embargo, cuando se añadían microsomas al sistema, las cadenas polipeptídicas en crecimiento se incorporaban a los microsomas y las secuencias señal eran eliminadas mediante una rotura proteolítica.

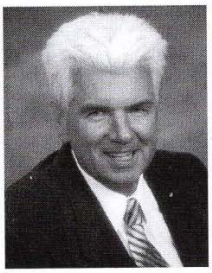


EXPERIMENTO CLAVE

Hipótesis de la señal

Transferencia de proteínas a través de membranas. I. Presencia de cadenas ligeras de inmunoglobulinas procesadas proteolíticamente y sin procesar en ribosomas unidos a membrana procedentes de mieloma murino

Günter Blobel y Bernhard Dobberstein
Rockefeller University, New York
Journal of Cell Biology, 1975, Volumen 67, págs. 835-851



Günter Blobel

Contexto

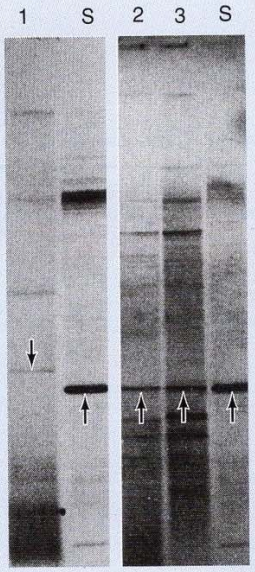
¿Cómo se transfieren las cadenas polipeptídicas específicas a través de las membranas adecuadas? Estudios en los años 50 y 60 indicaban que las proteínas secretadas eran sintetizadas en ribosomas unidos a membrana y que se transferían a través de la membrana durante su síntesis. Sin embargo, esto no explicaba por qué los ribosomas implicados en la síntesis de las proteínas secretadas se unen a la membrana mientras que los ribosomas que sintetizan las proteínas citosólicas no lo hacen. Una hipótesis para explicar esta diferencia fue sugerida por primera vez por Günter Blobel y David Sabatini en 1971. En ese momento propusieron que:
1) Los ARNm que se traducían en los ribosomas unidos a membrana contenían un conjunto característico de codones justo en 3' a partir del sitio de iniciación, 2) la traducción de estos codones genera una secuencia característica en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento (la secuencia señal), y 3) la secuencia señal provoca la unión del ribosoma a la membrana. En 1975, Blobel y Dobberstein informaron acerca de una serie de experimentos que apoyaban esta idea. Además, propusieron una «versión algo más detallada de esta hipótesis, en lo sucesivo llamada la hipótesis de la señal».

Experimentos

Los mielomas son cánceres de linfocitos B que secretan inmunoglobulinas activamente, por lo que proporcionan un buen modelo para los estudios de proteínas secretadas. Estudios previos en el laboratorio de Cesar Milstein habían demostrado que las proteínas producidas por la traducción *in vitro* del ARNm de la cadena ligera de las inmunoglobulinas contienen aproximadamente 20 aminoácidos en su extremo amino-terminal que no están presentes en las cadenas ligeras secretadas. Este resultado condujo a la suposición de que estos aminoácidos dirigen la unión del ribosoma a la membrana. Para comprobar esta idea, Blobel y Dobberstein investigaron la síntesis de cadenas ligeras, por ribosomas unidos a membrana, a partir de las células del mieloma.

Como era de esperar por trabajos previos, la traducción *in vitro* del ARNm de las cadenas ligeras en los ribosomas libres daba lugar a una proteína que era más grande que la cadena ligera secretada (véase la figura). Por el contrario, la traducción *in vitro* del ARNm asociado a los ribosomas unidos a membrana de las células del mieloma, daba lugar a una proteína que tenía el mismo tamaño que la cadena ligera secretada normal. Es más, las cadenas ligeras sintetizadas por los ribosomas que permanecían unidos a los microsomas eran resistentes a la digestión por proteasas añadidas, lo que indicaba que las cadenas ligeras habían sido trasferidas a los microsomas.

Estos resultados indicaban que una secuencia señal amino-terminal es eliminada por una proteasa en los microsomas a medida que las cadenas polipeptídicas en crecimiento se trasfieren a través de la membrana. Los resultados se interpretaron en términos de una versión más detallada de la hipótesis de la señal. Como expusieron Blobel y Dobberstein «la característica esencial de la hipótesis de la señal es la existencia de una secuencia única de codones, localizada inmediatamente a la derecha del codón de iniciación, que está presente sólo en aquellos ARNm cuyos productos de traducción han de ser transferidos a través de una membrana».



La traducción *in vitro* del ARNm de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas en ribosomas libres (carril 1) da lugar a un producto que migra más lentamente que las cadenas ligeras secretadas (carril S) en la electroforesis en gel. Por el contrario, las cadenas ligeras sintetizadas por la traducción *in vitro* en ribosomas unidos a membranas (carril 2) tienen el mismo tamaño que las cadenas ligeras secretadas. Además, a los productos de la traducción *in vitro* en ribosomas unidos a membrana no les afectó la digestión posterior con proteasas (carril 3), lo que indica que estaban protegidos de las proteasas por la inserción en los microsomas.

EXPERIMENTO CLAVE

Impacto

La transferencia selectiva de proteínas a través de las membranas es fundamental para el mantenimiento de los orgánulos rodeados por membrana de las células eucariotas. Para mantener la identidad de estos orgánulos, las proteínas deben ser translocadas específicamente a través de las membranas apropiadas. La hipótesis de la señal proporcionó la base conceptual para comprender este fenómeno. Este modelo básico no sólo ha sido comprobado firmemente para la transferencia de proteínas secretadas en el retículo endoplásmico, sino que también ha proporcionado el marco para comprender el marcaje y dirección de las proteínas a todos los compartimentos de la célula rodeados por membrana, y por consiguiente causando un impacto en prácticamente todas las áreas de la biología celular.

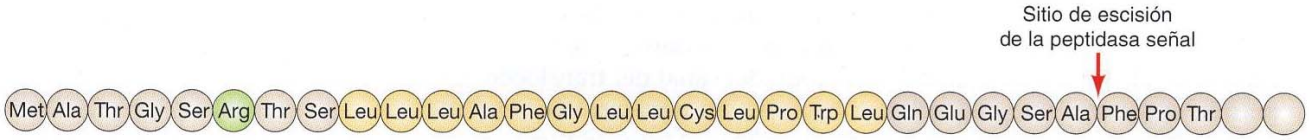


FIGURA 11.6 Secuencia señal de la hormona del crecimiento. La mayoría de las secuencias (p. ej., hormona de crecimiento) señal contienen un segmento de aminoácidos hidrófobos (amarillo), precedido por residuos básicos).

7-12 residuos hidrófobos, habitualmente en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica (**Fig. 11.6**). A medida que salen del ribosoma, las secuencias señal son reconocidas y unidas a una **partícula de reconocimiento de la señal (ARNsrp)** que está constituida por seis polipéptidos y un ARN citoplásmico pequeño (**ARNsrp**). La PRS se une tanto al ribosoma como a la secuencia señal, inhibiendo la traducción y dirigiendo todo el complejo (PRS, ribosoma, y la cadena polipeptídica en crecimiento) al RE mediante la unión al **receptor de la PRS** en la membrana del RE (**Fig. 11.7**). La unión al

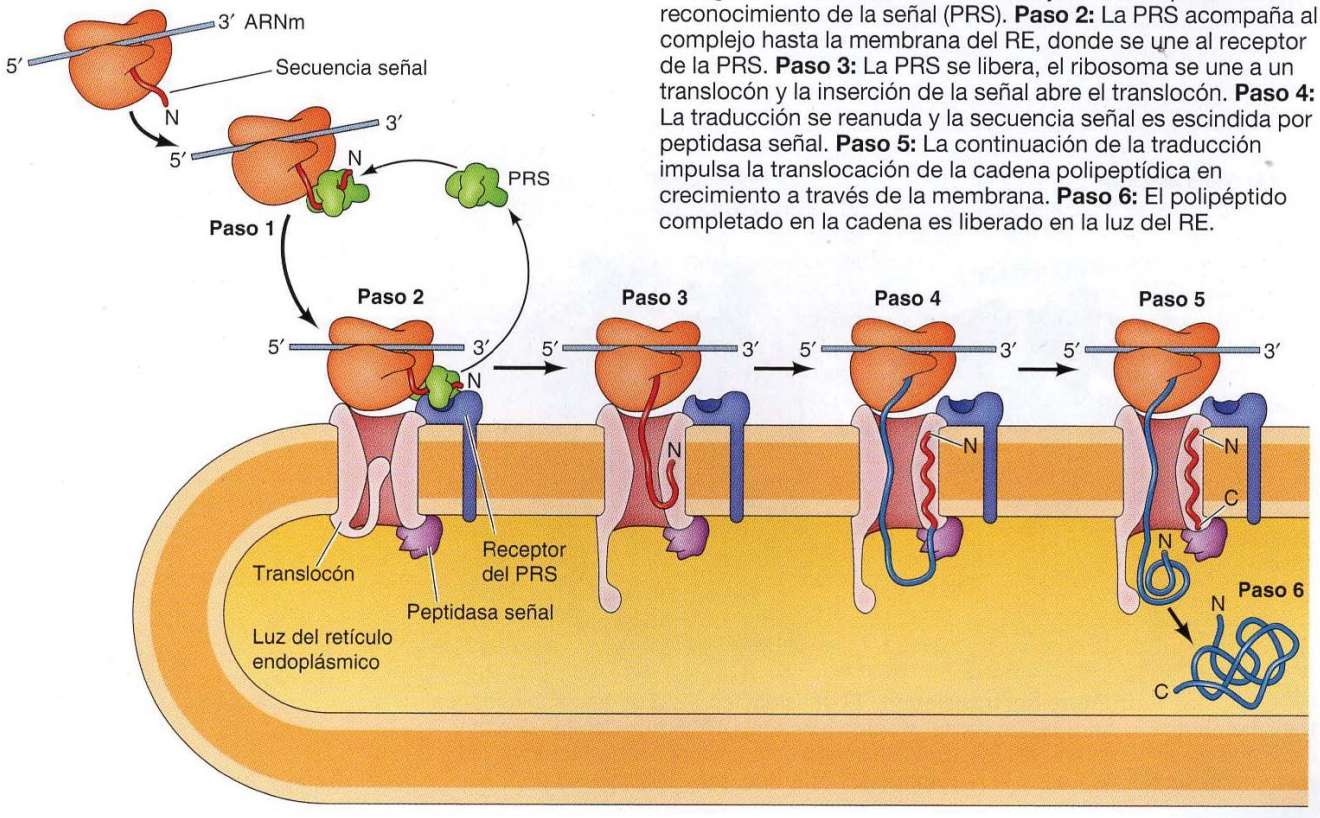


FIGURA 11.7 Dirección cotraduccional de proteínas de secreción al RE. Paso 1: A medida que la secuencia señal emerge del ribosoma, es reconocida y unida a la partícula de reconocimiento de la señal (PRS). **Paso 2:** La PRS acompaña al complejo hasta la membrana del RE, donde se une al receptor de la PRS. **Paso 3:** La PRS se libera, el ribosoma se une a un translocón y la inserción de la señal abre el translocón. **Paso 4:** La traducción se reanuda y la secuencia señal es escindida por peptidasa señal. **Paso 5:** La continuación de la traducción impulsa la translocación de la cadena polipeptídica en crecimiento a través de la membrana. **Paso 6:** El polipéptido completado en la cadena es liberado en la luz del RE.

receptor libera la SRP del ribosoma y de la secuencia señal de la cadena polipeptídica creciente. A continuación, el ribosoma se une a un complejo de translocación de proteínas o **translocón** en la membrana del RE, y la secuencia señal es insertada en un canal de membrana.

El conocimiento de aspectos cruciales del proceso de translocación a través de la membrana del RE provino de la identificación de la estructura del translocón por parte de Tom Rapoport y su equipo en 2004. En células de levaduras y mamíferos, los translocones que atraviesan la membrana del ER son complejos de tres proteínas transmembrana denominadas proteínas Sec61 (**Fig. 11.8**). Las proteínas del translocón de levaduras y mamíferos están muy relacionadas con las proteínas de la membrana plasmática que realizan la translocación de los polipéptidos secretados por las bacterias, mostrando una llamativa conservación de la maquinaria de secreción de proteínas en células procariotas y eucariotas. La inserción de la secuencia señal abre el translocón retirando un tapón del canal del translocón. Esto permite que la cadena polipeptídica creciente sea transferida a través del translocón a medida que avanza la traducción. Así pues, el proceso de la síntesis proteica produce directamente la transferencia de las cadenas polipeptídicas nacientes a través del translocón al RE. A medida que se produce la translocación, una **señal-peptidasa** escinde la secuencia señal y el polipéptido se libera a la luz del RE.

Muchas proteínas en las levaduras, así como algunas proteínas en las células de los mamíferos, son dirigidas al RE tras haber sido traducidas (translocación postraduccional), en lugar de ser transferidas al RE durante su síntesis en los ribosomas unidos a la membrana. Estas proteínas son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres, y su incorporación postraduccional al RE no requiere una PRS. En su lugar, sus secuencias señal son reconocidas por proteínas receptoras diferentes (el complejo Sec62/63) asociadas con el translocón en la membrana del RE (**Fig. 11.9**). Se requieren las chaperonas citosólicas Hsp70 para mantener a las cadenas polipeptídicas en

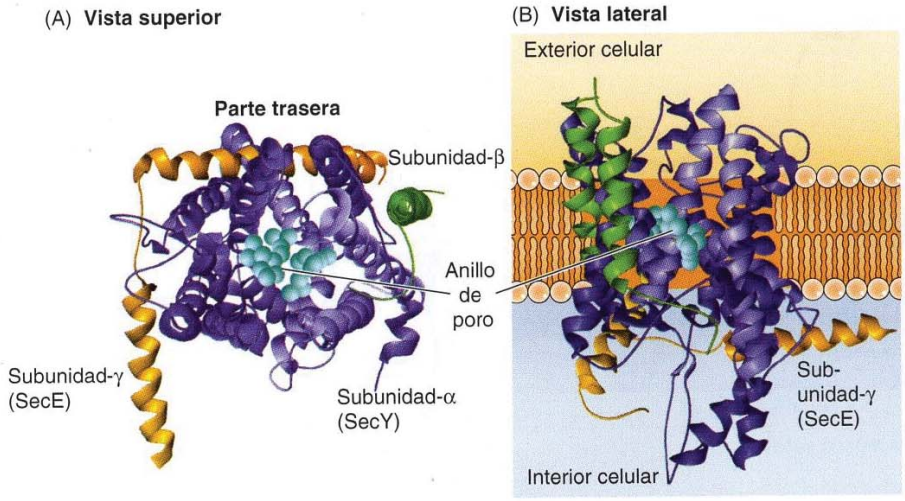


FIGURA 11.8 Estructura del translocón. El translocón consta de tres subunidades transmembrana, mostradas en verde, morado y amarillo. (A) Arriba del translocón insertado en la membrana del ER. (B) Vista lateral del translocón introducido en la membrana del RE. (E. Park y T. A. Rapoport, 2012. *Ann. Rev. Biophys*. 41:21.)

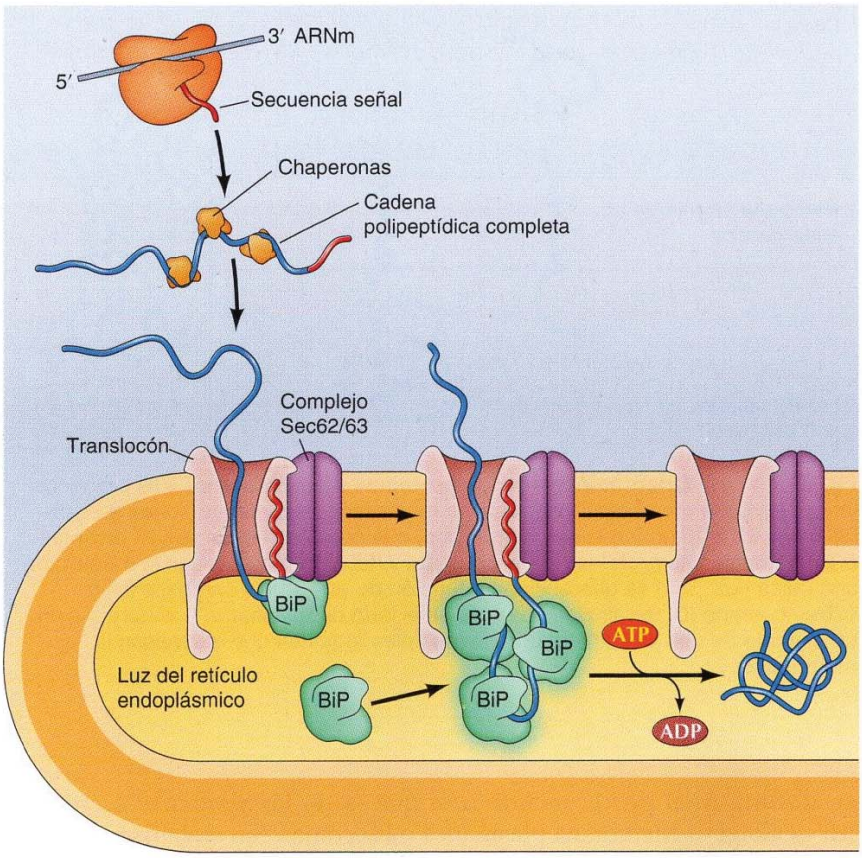


FIGURA 11.9 Translocación postraduccional de las proteínas en el RE. Las proteínas destinadas a una internalización postraduccional al RE se sintetizan en ribosomas libres y se mantienen en una conformación desplegada mediante chaperonas citosólicas. Son reconocidas por el complejo Sec62/63 y sus secuencias señal se insertan en el translocón en la membrana del RE. La proteína Sec63 está asociada también a una proteína chaperona (denominada BiP). La unión de múltiples moléculas de BiP y su liberación (unida a hidrólisis de ATP) impulsan la translocación de la cadena polipeptídica en el RE.

su conformación primaria para que puedan penetrar en el translocón, y otra chaperona Hsp70 en el interior del RE (denominada BiP) es necesaria para permitir que la cadena polipeptídica atraviese el canal hasta el interior del RE. Múltiples moléculas de BiP se unen a la cadena polipeptídica a medida que experimentan translocación en el RE, lo que impide que se deslicen hacia atrás y las impulsa de manera eficaz a través del canal. La translocación postraduccional de las proteínas en el RE es así activada por la BiP, mientras que la translocación cotraduccional de cadenas polipeptídicas en crecimiento es impulsada directamente por el proceso de síntesis de proteínas.

Inserción de las proteínas en la membrana del RE

Las proteínas cuyo destino es ser secretadas o residir en la luz del RE, aparato de Golgi, o lisosomas son translocadas a través de la membrana y liberadas en la luz del RE tal como ya se ha descrito. Sin embargo, las proteínas destinadas a incorporarse en la membrana plasmática o en la membrana del RE, Golgi, o lisosomas se insertan inicialmente en la membrana del RE en lugar de ser liberadas a la luz. Desde la membrana del RE continúan hasta

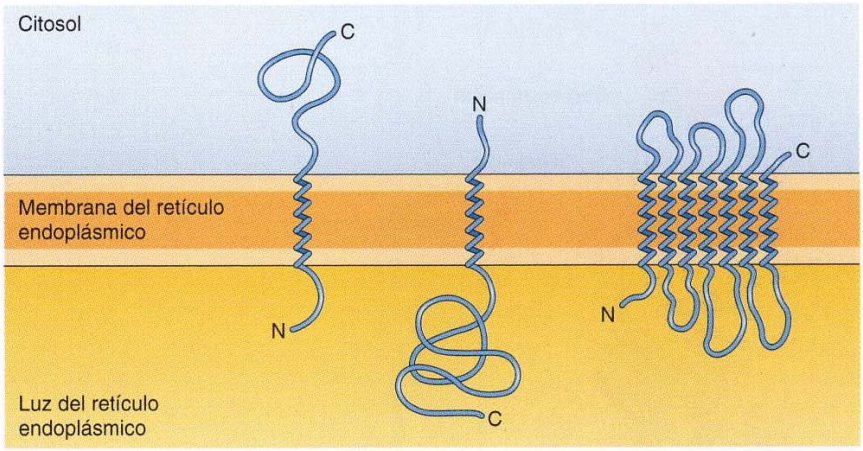


FIGURA 11.10 Orientaciones de las proteínas de membrana. Las proteínas integrales de la membrana atraviesan la membrana mediante regiones en alfa-hélice de 20 a 25 aminoácidos hidrófobos, que pueden insertarse con distintas orientaciones. Las proteínas de la izquierda y del centro atraviesan la membrana una única vez, pero se diferencian en función de que sea el carboxilo (N) o extremo amino (C) terminal el que está en el lado citoplásmico. A la derecha hay un ejemplo de una proteína que tiene múltiples regiones que atraviesan la membrana.

su destino final por la misma ruta que la de las proteínas secretadas: RE → Golgi → Membrana plasmática o lisosomas. Sin embargo, estas proteínas son transportadas a lo largo de esta ruta como componentes de la membrana, en lugar de como proteínas solubles.

Las proteínas integrales de la membrana se incluyen en la membrana mediante regiones hidrofóbicas que atraviesan la bicapa lipídica (véase Fig. 2.34). Las partes de estas proteínas que atraviesan la membrana suelen ser regiones en hélice alfa constituidas por 20 a 25 aminoácidos hidrófobos. La formación de una hélice alfa maximiza los puentes de hidrógeno entre los enlaces peptídicos, y las cadenas laterales hidrófobas de los aminoácidos interaccionan con las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos. Sin embargo, las distintas proteínas integrales de la membrana difieren en cómo están insertadas. (**Fig. 11.10**). Por ejemplo, mientras que algunas proteínas integrales atraviesan la membrana una sola vez, otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. Además, algunas proteínas están orientadas en la membrana con su extremo carboxilo-terminal en el lado citosólico; otras tienen su extremo amino-terminal expuesto al citosol. La orientación de las membranas proteínicas insertadas se establece a medida que las cadenas polipeptídicas en crecimiento se translocan en el RE. La luz del RE equivale topológicamente al exterior de la célula, por lo que los dominios de las proteínas de la membrana plasmática que están expuestos en la superficie celular se corresponden con las regiones de la cadena polipeptídica que se translocan al interior del RE (**Fig. 11.11**).

La mayor parte de las proteínas son insertadas en la membrana del RE por la vía cotraduccional SRP/Sec61 descrita anteriormente. Muchas de las proteínas son insertadas directamente en la membrana del RE por secuencias transmembrana internas que son reconocidas y llevadas al translocón por SRP, pero no escindidas por la peptidasa señal (**Fig. 11.12**). En su lugar, estas hélices α de transmembrana salen del translocón lateralmente y fijan las proteínas en el RE. La secuencia transmembrana hidrófoba señala un cambio en el translocón, con lo que provoca la apertura de las hélices exten-

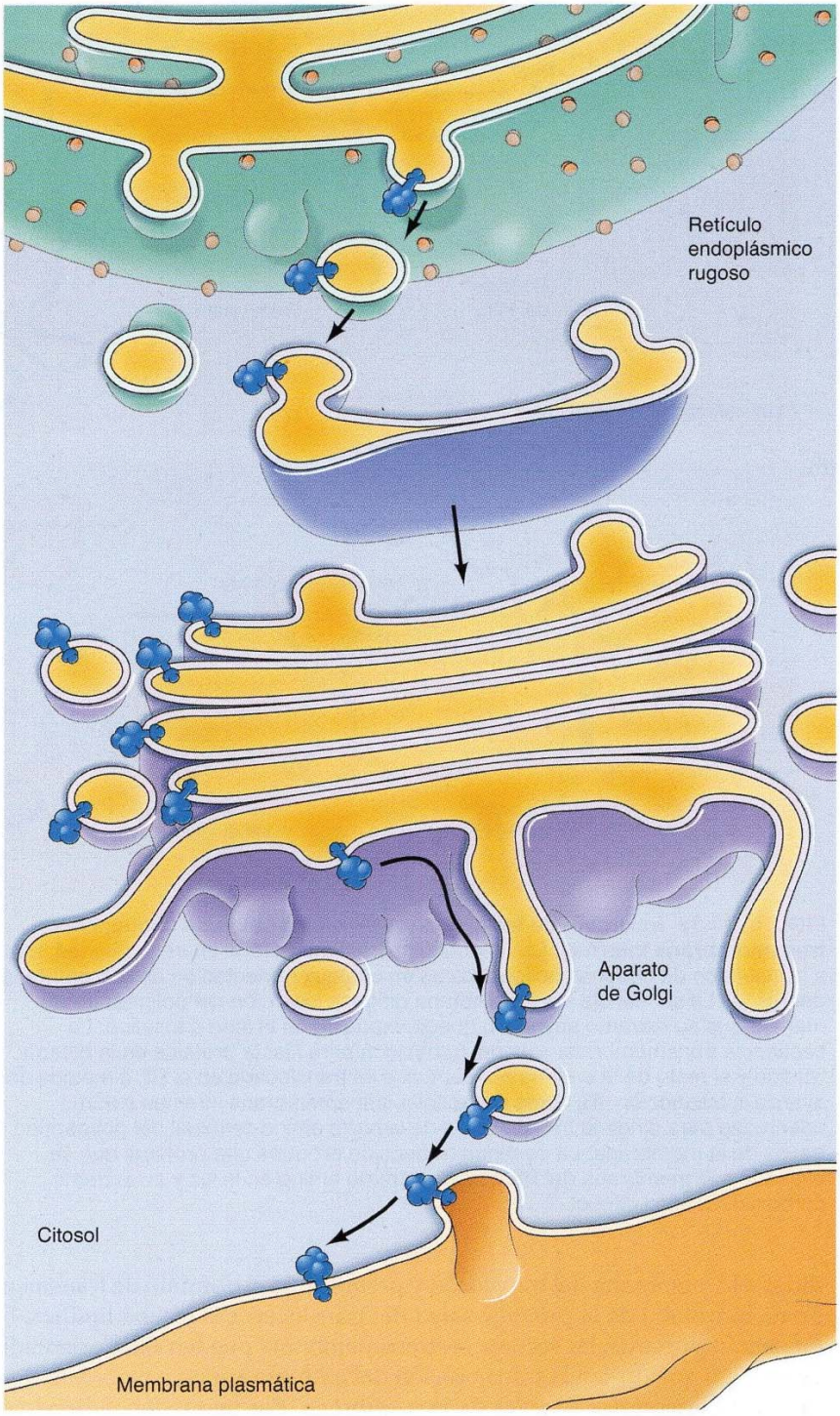


FIGURA 11.11 Topología de la vía secretora. La luz del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi son topológicamente equivalentes al exterior de la célula. Por tanto, aquellas partes de las cadenas polipeptídicas que se translocan al interior del RE son expuestas en la superficie celular tras su transporte a la membrana plasmática.

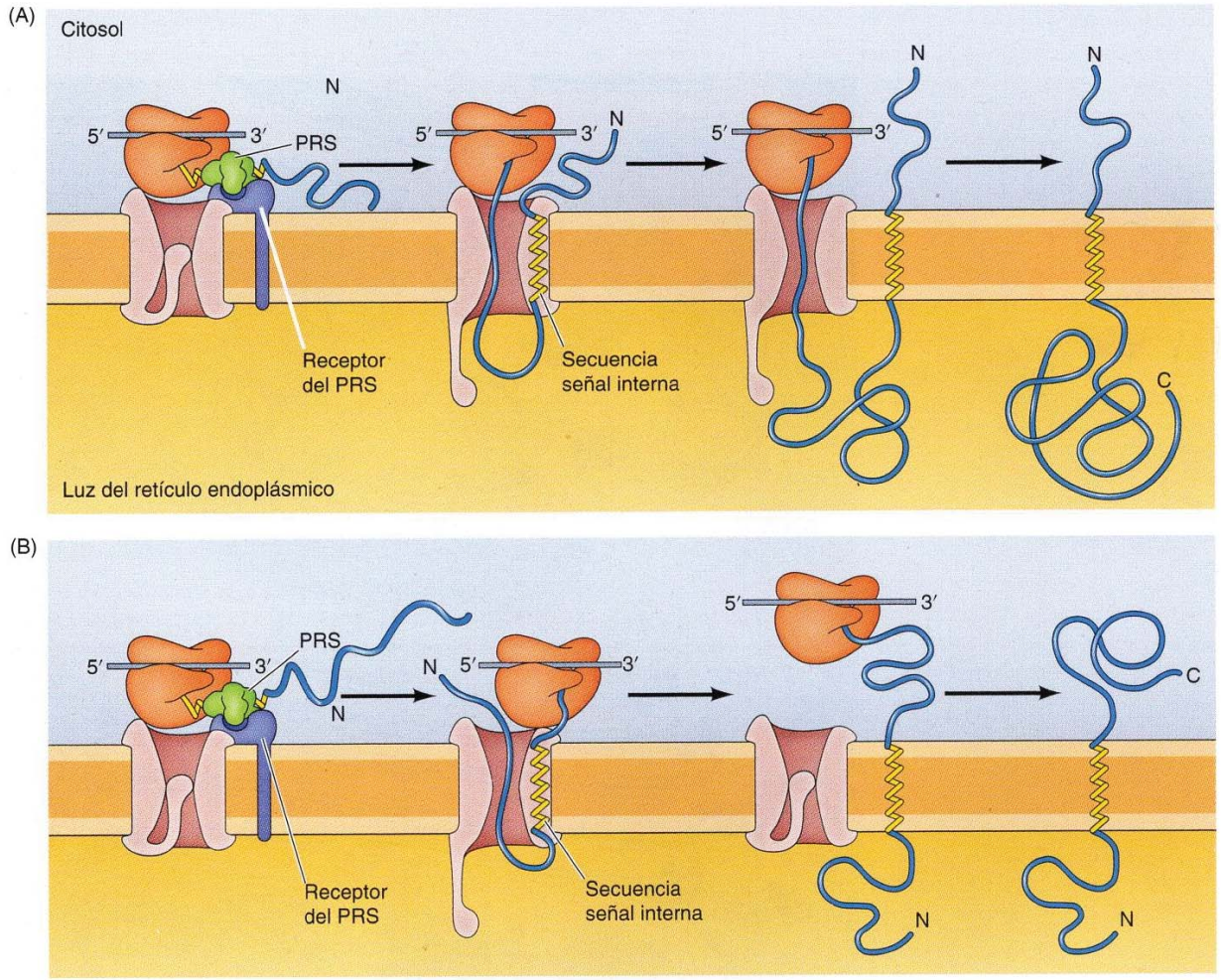


FIGURA 11.12 Inserción de las proteínas de membrana con secuencias transmembrana internas. Las secuencias transmembrana internas pueden llevar a la inserción de cadenas polipeptídicas en cualquier orientación en la membrana del RE. (A) La secuencia transmembrana dirige la inserción del polipéptido de manera que su extremo amino (N) queda expuesto en el lado citosólico. La secuencia transmembrana sale del translocón para fijar la proteína en la bicapa lipídica y el resto de la cadena polipeptídica es translocada en el RE a medida que avanza la traducción. (B) Otras secuencias transmembrana internas están orientadas para dirigir la transferencia de la parte amino-terminal del polipéptido a través de la membrana. La continua traducción produce una proteína que se extiende a la membrana del RE con su extremo amino en la luz y su extremo carboxilo (C) en el citosol.

didas a la membrana del translocón y permite que el dominio de transmembrana hidrófobo de la proteína salga del translocón a la bicapa lipídica. De manera importante, las secuencias transmembrana pueden estar orientadas de manera que dirijan la translocación del extremo amino o carboxilo de la cadena polipeptídica a través de la membrana. Por tanto, dependiendo de la orientación de la secuencia señal de transmembrana, las proteínas insertadas en la membrana por este mecanismo pueden tener su extremo amino o carboxilo expuesto al citosol.

Algunas proteínas transmembrana orientadas con sus extremos carboxilo expuestos al citosol se insertan en la membrana del RE por medio de un mecanismo alternativo (**Fig. 11.13**). Estas proteínas tienen una secuencia señal amino-terminal normal, que es escindida por la peptidasa señal durante

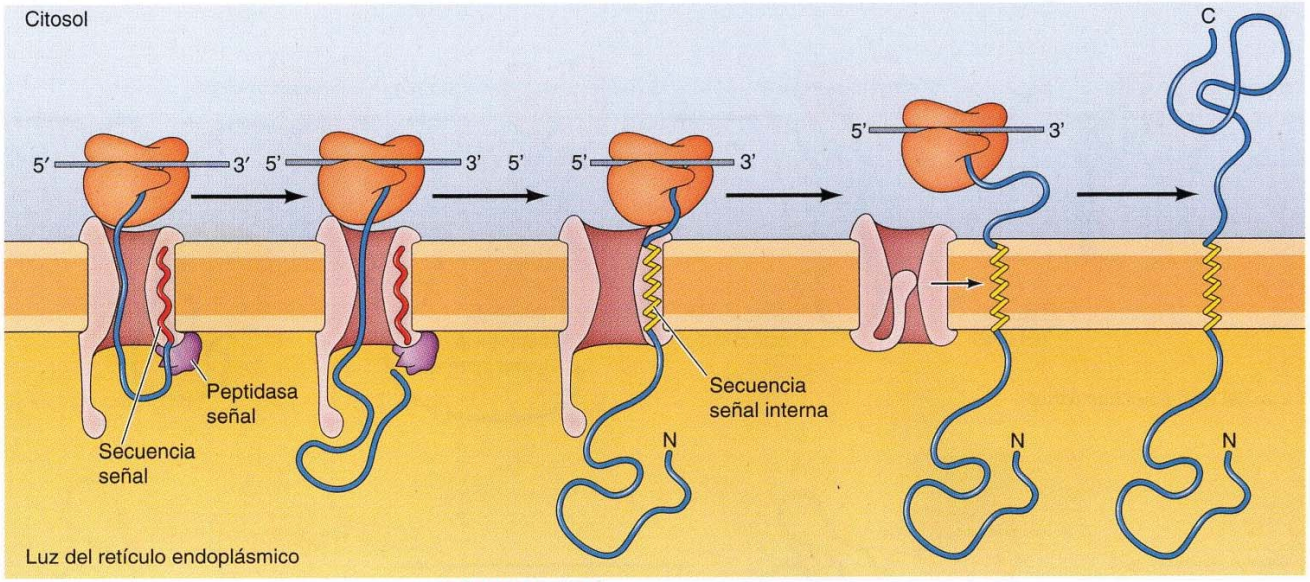


FIGURA 11.13 Inserción de una proteína de membrana con una secuencia señal escindible y una secuencia transmembrana interna. La secuencia señal se escinde cuando la cadena polipeptídica atraviesa la membrana, de manera que el extremo amino de la cadena polipeptídica queda expuesto en la luz del RE. Sin embargo, la translocación de la cadena polipeptídica a través de la membrana se interrumpe cuando el translocón reconoce una secuencia transmembrana. Esto permite que la proteína salga del translocón lateralmente y se fije en la membrana del RE. La traducción continua produce una proteína extendida a la membrana con su extremo carboxilo en el lado citosólico.

la translocación de la cadena polipeptídica a través del translocón. La parte amino-terminal en crecimiento del polipéptido es translocada en el RE a medida que avanza la traducción. La translocación del polipéptido es interrumpida por una hélice α extendida a la membrana en mitad de la proteína, que fija el polipéptido a la membrana. La salida de esta hélice α extendida a la membrana del translocón bloquea la ulterior translocación del polipéptido, con lo cual la porción carboxilo-terminal de la cadena polipeptídica en desarrollo permanece en el citosol. Este mecanismo es utilizado preferentemente por las proteínas con grandes dominios amino-terminales insertados en el RE, dado que la translocación de estos dominios amino-terminales a través de la membrana es impulsada de forma cotraduccional.

Las proteínas que se extienden a la membrana varias veces se insertan como consecuencia de una serie de secuencias transmembrana con orientaciones alternas. Por ejemplo, una secuencia transmembrana interna puede llevar a la inserción en la membrana de una cadena polipeptídica con su extremo amino en el lado citosólico (**Fig. 11.14**). La traducción continua activa así la síntesis de la cadena polipeptídica dentro de la luz del RE. Si se encuentra entonces un segundo dominio extendido a la membrana, la cadena polipeptídica saldrá del translocón para formar un bucle en la luz del RE, y la síntesis de proteínas continuará en el lado citosólico de la membrana. Si se encuentra una tercera secuencia transmembrana, la cadena polipeptídica en crecimiento se insertará de nuevo en el RE, para formar otro dominio en bucle en el lado citosólico de la membrana. Esta acción se sigue de más dominios de transmembrana, que provocan la inserción de proteínas extendidas a la membrana múltiples veces, con dominios en bucle expuestos en los lados de la luz y citosólico.

Algunas proteínas con una secuencia transmembrana en su extremo carboxilo se insertan en la membrana del RE por medio de una vía postraduc-

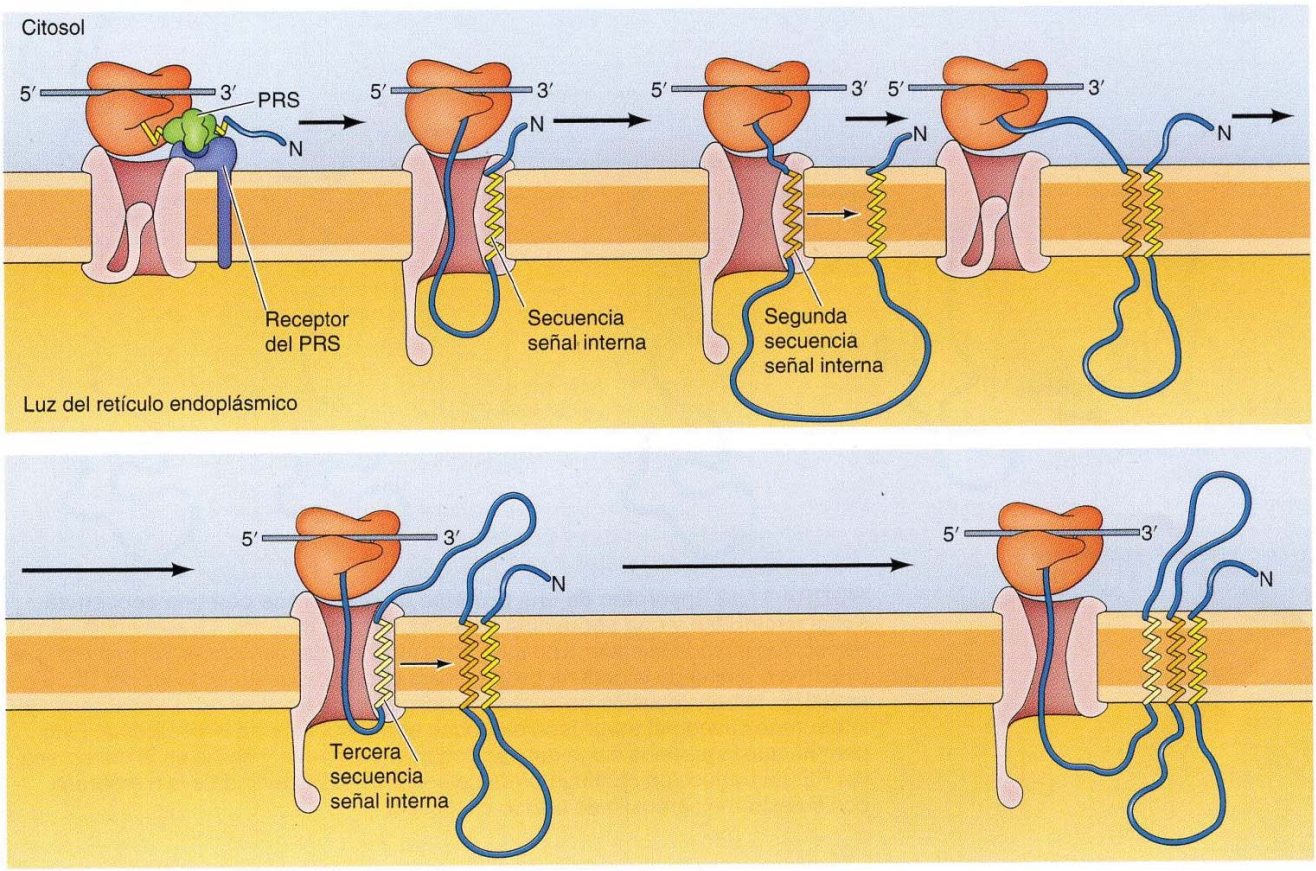


FIGURA 11.14 Inserción de una proteína que atraviesa la membrana varias veces. En este ejemplo, una secuencia transmembrana interna da lugar a la inserción de la cadena polipeptídica con su extremo amino terminal en el lado citosólico de la membrana. La traducción prosigue hasta que se encuentra una segunda secuencia transmembrana. Esto provoca que la cadena polipeptídica forme un bucle dentro de la luz del RE; la traducción continúa en el citosol. Una tercera secuencia transmembrana interna reabre el canal, desencadenando la reinserción de la cadena polipeptídica en el translocón y formando un bucle en el citosol. El proceso puede repetirse muchas veces, dando lugar a la inserción de proteínas con múltiples regiones que atraviesan la membrana.

cional alternativa. Estas proteínas no pueden ser reconocidas por el SRP, debido a que su dominio de transmembrana en posición carboxilo-terminal no emerge del ribosoma hasta que termina la traducción y se libera la cadena polipeptídica completa del ribosoma. En su lugar, los dominios de transmembrana de estas proteínas son reconocidos por un factor de direccionamiento distinto (denominado TRC40 o GET3) una vez que se completa la traducción (**Fig. 11.15**). A continuación, el TRC40 escolta a la proteína transmembrana a la membrana del RE, donde se inserta a través del receptor GET1-GET2.

Como se analiza más adelante, la mayoría de las proteínas transmembrana destinadas para otros compartimentos de la vía secretora se envían a ellos en vesículas de transporte. Sin embargo, las proteínas que se incorporan a la membrana nuclear interna (que es continua con el RE) difunden lateralmente en la membrana en lugar de transportarse en vesículas. Algunos datos recientes indican que las proteínas de la membrana nuclear interna (como la emerina o el receptor de laminina B; véase Cap. 10) poseen secuen-

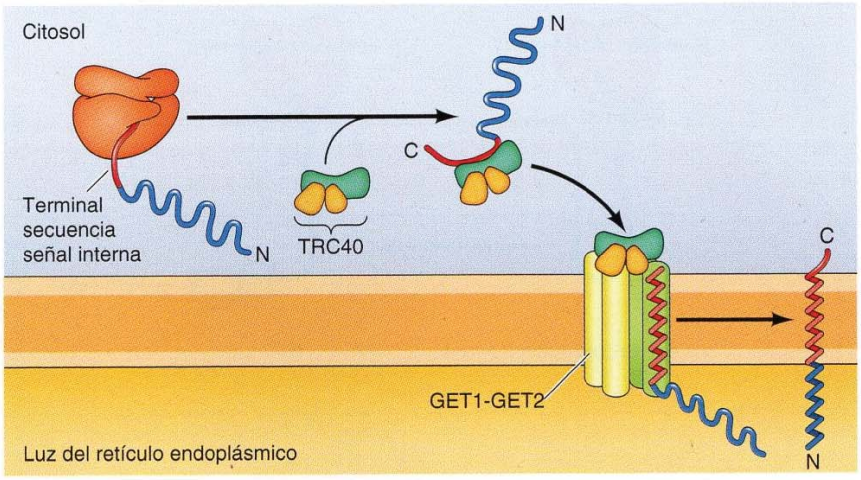


FIGURA 11.15 Inserción postraduccional de una proteína con una secuencia transmembrana C-terminal. Las proteínas con una secuencia transmembrana en su extremo carboxilo (C) no son reconocidas por el SRP dado que la secuencia C-terminal no sale del ribosoma hasta que se completa la traducción. En su lugar, estas proteínas son reconocidas de forma postraduccional por el factor de direccionamiento TRC40 que las lleva al receptor GET1-GET2. Se insertan en la membrana del RE con sus dominios C-terminales en el lado citosólico.

cias transmembrana específicas que marcan su transporte a la membrana nuclear interna, donde quedan retenidas por interacciones con componentes nucleares tales como laminas o cromatina.

Plegamiento y procesamiento de las proteínas en el RE

El plegamiento de las cadenas polipeptídicas en sus conformaciones tridimensionales correctas, el ensamblaje de los polipéptidos en proteínas constituidas por varias subunidades, y las modificaciones covalentes implicadas en el procesamiento de las proteínas se trataron en el Capítulo 9. Con respecto a las proteínas que entran en la vía secretora, muchos de estos acontecimientos ocurren durante la translocación a través de la membrana del RE o en el interior de la luz del RE. Uno de estos procesos es la rotura proteolítica del péptido secuencia señal a medida que la cadena polipeptídica se transloca a través de la membrana del RE. El RE es también el sitio donde tiene lugar el plegamiento de las proteínas, el ensamblaje de proteínas de varias subunidades, la formación de los puentes disulfuro, *N*-glucosilación, y la adición de anclajes de glicolípidos a algunas proteínas de la membrana plasmática. De hecho, el papel principal de las proteínas de la luz del RE es catalizar el plegamiento y ensamblaje de los polipéptidos recién translocados.

Como ya se ha dicho, las proteínas se translocan a través de la membrana del RE a modo de cadenas polipeptídicas sin plegar mientras prosigue su traducción. Por tanto, estos polipéptidos se pliegan en su conformación tridimensional en el RE, asistidos por las chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento de las cadenas polipeptídicas (véase Cap. 9). Se cree que la chaperona Hsp70, BiP, se une a la cadena polipeptídica sin plegar cuando cruza la membrana, y después media el plegamiento proteico y el ensamblaje de proteínas con múltiples subunidades, en el interior del RE (**Fig. 11.16**). Las proteínas correctamente ensambladas son liberadas de BiP y otras chaperonas, y así están disponibles para su transporte al aparato de Golgi. Las proteínas plegadas de forma anómala o incorrectamente ensambladas son dianas de degradación, como se estudia más adelante.

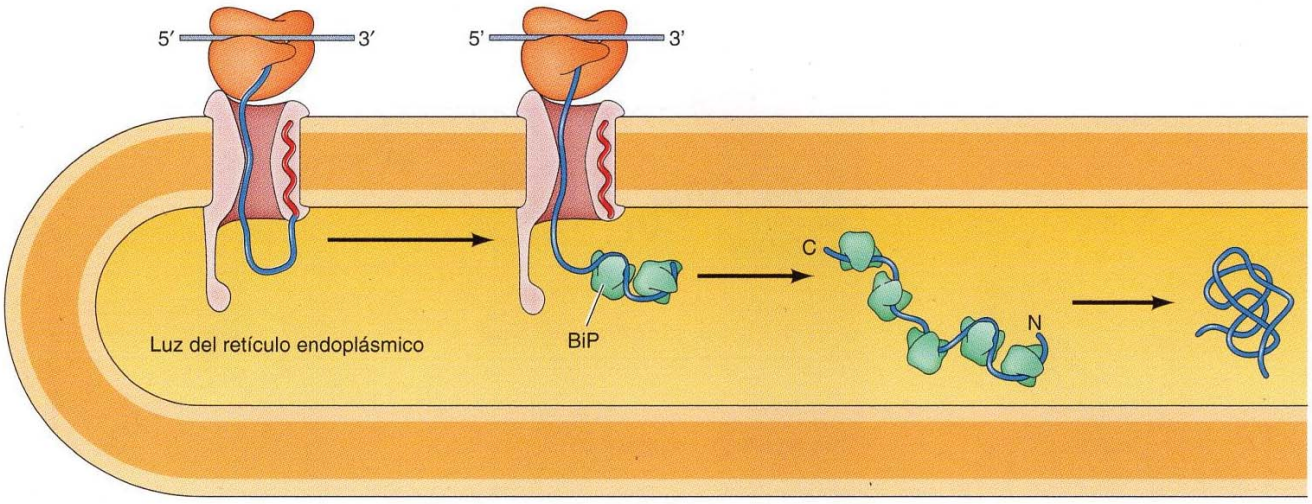


FIGURA 11.16 Plegamiento de proteínas en el RE. La chaperona molecular BiP se une a las cadenas polipeptídicas cuando atraviesan la membrana del RE y favorece el plegamiento y el ensamblaje de proteínas en el RE.

La formación de puentes disulfuro entre las cadenas laterales de los residuos de cisteína es un aspecto importante del plegamiento y ensamblaje proteico en el RE. Estos puentes no suelen formarse en el citosol, que se caracteriza por ser un ambiente reductor que mantiene la mayoría de los residuos de cisteína en su estado reducido (—SH). En el RE, sin embargo, un ambiente oxidante promueve la formación de puentes disulfuro (S—S), y los puentes disulfuro formados en el RE desempeñan un papel importante en la estructura de las proteínas secretadas y de la superficie celular. La formación de los puentes disulfuro está favorecida por la enzima **proteína disulfuro isomerasa** (véase Fig. 9.28) que se localiza en la luz del RE.

Las proteínas también son glicosiladas en residuos específicos de asparragina (*N*-glicosilación), en el RE, mientras se están traduciendo (**Fig. 11.17**). Como se trató en el Capítulo 9 (véase Fig. 9.33), se añaden unidades de oligosacáridos constituidas por 14 residuos de azúcar a los residuos de asparragina de las cadenas polipeptídicas en crecimiento, mientras están siendo translocadas al RE. El oligosacárido se sintetiza en un transportador lipídico (dolicol) anclado en la membrana del RE. Después se transfiere como una unidad a los residuos de asparragina aceptores en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr mediante una enzima unida a la membrana denominada oligosacaril transferasa. Tres residuos de glucosa son eliminados mientras que la proteína permanece en el RE, y la proteína se modifica aún más tras ser transportada al aparato de Golgi (analizado más adelante en este capítulo). La glicosilación ayuda a evitar la agregación de proteínas en el RE y añade señales que promueve el plegamiento de proteínas y su ulterior distribución en la vía secretoria.

Algunas proteínas se anclan a la membrana plasmática mediante glicolípidos en lugar de mediante regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la membrana. Debido a que estos glicolípidos anclados a la membrana contienen fosfatidilinositol, se denominan **anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GFI)** cuya estructura se muestra en la Figura 9.38. Los anclajes de GFI se ensamblan en la membrana del RE. Se unen inmediatamente después de completarse la síntesis de las proteínas, al residuo carboxilo terminal de algunas proteínas ancladas en la membrana por una secuencia hidrofóbica C-terminal (**Fig. 11.18**). La secuencia C-terminal de la proteína es escindida e intercam-

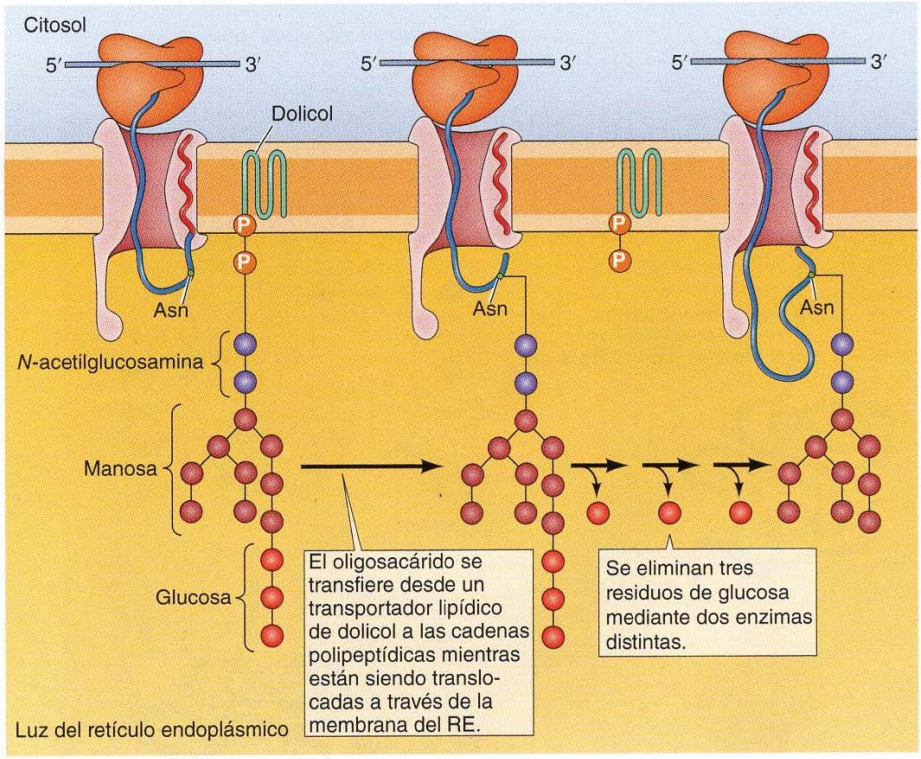


FIGURA 11.17 Glicosilación de proteínas en el RE. Las proteínas son glicosiladas con RE al añadir 14 residuos de azúcar del oligosacárido a un residuo de asparagina (Asn). Se eliminan tres residuos de glucosa mientras que la proteína todavía continúa dentro del RE.

biada por el ancla GPI, por lo que estas proteínas permanecen unidas a la membrana sólo a través del glicolípido. Al igual que las proteínas transmembrana, son transportadas a la superficie celular como componentes de la membrana a través de la vía secretora. Su orientación en el RE determina que las proteínas ancladas al GFI sean expuestas hacia el exterior de la célula, permaneciendo unidas a la membrana a través del anclaje de GFI.

Control de calidad en el RE

Muchas de las proteínas sintetizadas en el RE son rápidamente degradadas, principalmente porque no se pliegan correctamente. El plegamiento de las proteínas en el RE es lento e ineficiente, y muchas proteínas nunca alcanzan sus conformaciones correctamente plegadas. Esas proteínas mal plegadas son retiradas del ER gracias a un proceso conocido habitualmente como **degradación asociada al RE (ERAD)**, por el que se identifican las proteínas mal plegadas, salen del RE y vuelven al citosol, y son degradadas por el sistema de ubicuitina-proteasoma.

Dado que ayudan a las proteínas a realizar un plegamiento correcto, las chaperonas y las enzimas de procesamiento de proteínas en la luz del RE actúan a menudo como sensores de proteínas con defectos de plegamiento. Una vía bien caracterizada de plegamiento de glicoproteínas está relacionada con las chaperonas **calnexina** y **calreticulina**, situadas en la luz del RE y en la membrana del RE, respectivamente. La calnexina y la calreticulina reconocen los oligosacáridos procesados parcialmente de los cuales

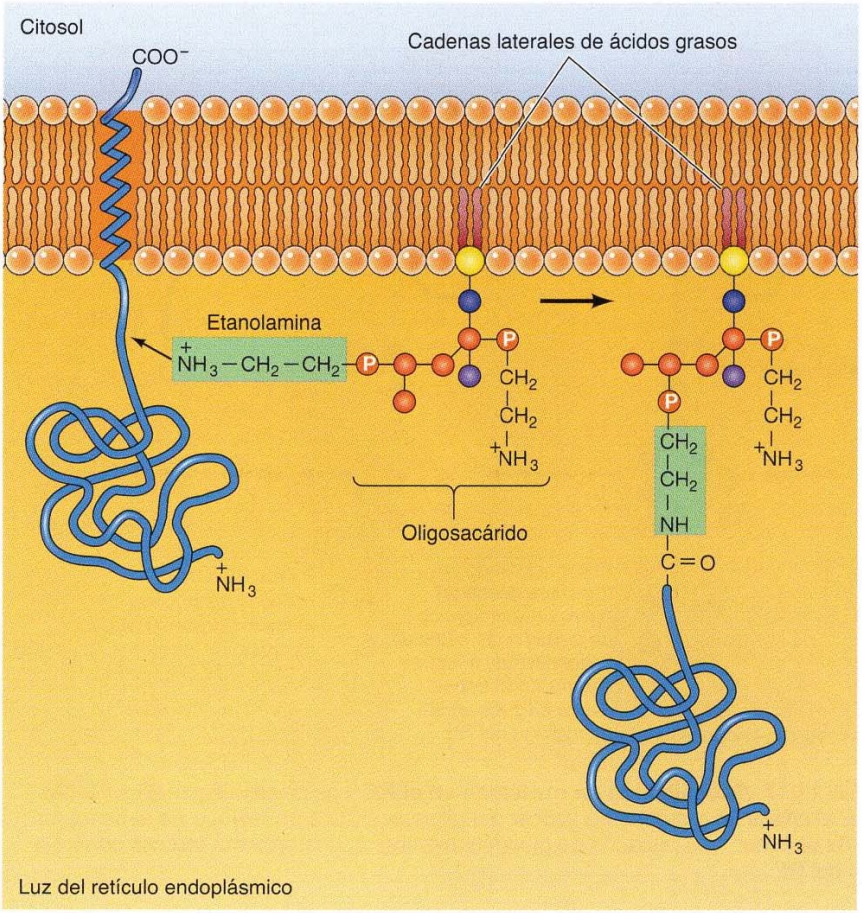


FIGURA 11.18 Unión de los anclajes de GFI. Los anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GFI) contienen dos cadenas de ácidos grasos, un resto oligosacárido constituido por inositol y otros azúcares, y etanolamina (véase Fig. 9.38 para una estructura más detallada). Los anclajes de GFI se ensamblan en el RE y se unen a los polipéptidos anclados en la membrana por una región carboxilo terminal que atraviesa la membrana. La región que atraviesa la membrana se escinde, y el nuevo extremo carboxilo terminal se une al grupo NH_2 de la etanolamina inmediatamente después de que haya finalizado la traducción, dejando a la proteína unida a la membrana mediante el anclaje de GFI.

se han eliminado dos residuos de glucosa terminal (**Fig. 11.19**). La calnexina o la calreticulina, en asociación con una proteína disulfuro isomerasa y una peptidil-prolil isomerasa (véanse Figs. 9.28 y 9.29), facilitan el plegamiento de la glicoproteína en su conformación correcta. Después, la glicoproteína es liberada por la eliminación de un tercer residuo de glucosa terminal del oligosacárido. Se permite así el reconocimiento de la glicoproteína por un sensor de plegamiento de proteínas, que vigila si la glicoproteína ha alcanzado un estado totalmente plegado. En caso afirmativo, la glicoproteína se mueve para salir del RE y se desplaza al aparato de Golgi. Sin embargo, si la glicoproteína no se ha plegado correctamente, el sensor de plegamiento añadirá un residuo de glucosa al oligosacárido, con lo que lleva de nuevo el ciclo a la calnexina o la calreticulina para otro intento de corrección del plegamiento. Si la glicoproteína no consigue plegarse correctamente después de varios ciclos repetidos y/o presenta un defecto irreversible de plegamiento, es dirigida a la vía de ERAD para su degradación. La proteína con

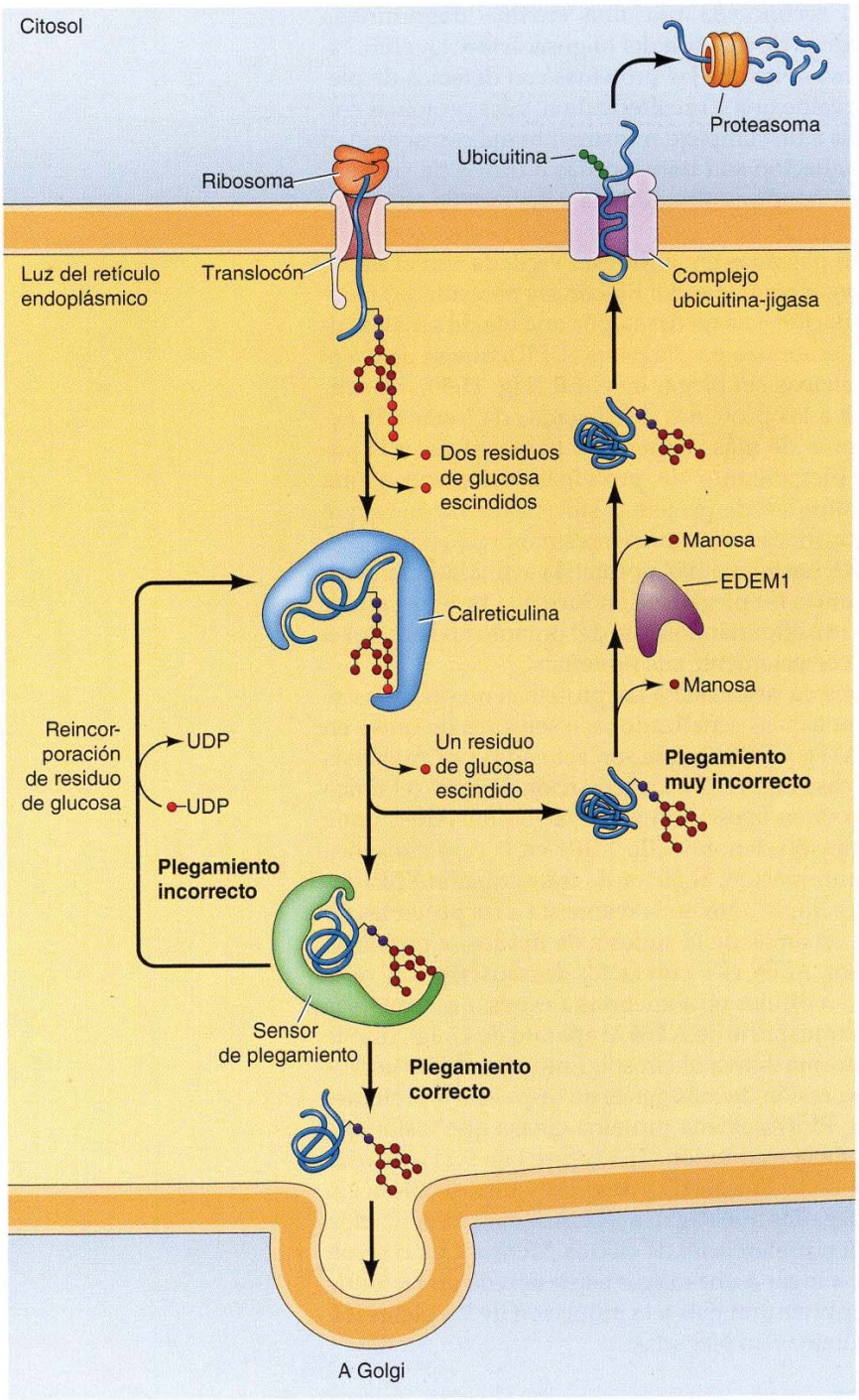


FIGURA 11.19 Plegamiento de proteínas por calnexina. Durante su salida a través del canal del translocón, se escinden dos residuos de glucosa de la glicoproteína para permitir la unión de la calnexina que facilitará el plegamiento. La escisión del restante residuo de glucosa pone punto final a la interacción con la calnexina y la glicoproteína para liberar a estas últimas. Un sensor de plegamiento de proteínas valora las regiones hidrofóbicas expuestas con el fin de evaluar el grado de plegamiento de la glicoproteína. La ausencia de estas regiones implica el plegamiento correcto de la proteína que prosigue hasta la salida. Si el plegamiento de la glicoproteína fuera incorrecto, el sensor, que posee actividad glucosiltransferasa, añadirá de nuevo un residuo de glucosa para unir de nuevo calnexina para otro intento de corrección del plegamiento. Sin embargo, si quedan expuestas demasiadas regiones hidrófobas y la proteína no puede ser plegada correctamente, la proteína es reconocida por EDEM1, que elimina los residuos de manosa. Se evita así que la proteína se una mediante la calnexina y la proteína se dirige de nuevo al citosol a través de un complejo ubicuitina-ligasa en la membrana del RE. En la cara citosólica de este complejo, la roteína es ubicuitilada y degradada en el proteasoma.

defecto de plegamiento es reconocida por una enzima denominada EDEM1, que elimina los residuos de manosa del oligosacárido. La eliminación de los residuos de manosa evita que las proteínas con defectos de plegamiento sean devueltas a la calnexina o la calreticulina, y las proteínas con estos defectos son transferidas a un complejo transmembrana con actividad de ubiquitina ligasa. A continuación son translocadas a través de su complejo de nuevo hasta el citosol, donde es ubiquitilada y degradada en el proteasoma (véase Fig. 9.46).

La cuantía de proteínas no plegadas en el RE está vigilada con el fin de coordinar la capacidad de plegar proteínas del ER con las necesidades fisiológicas de la célula. Esta regulación está mediada por una vía de señales conocida como **respuesta a las proteínas no plegadas (UPR),** que se activa si se acumulan demasiadas proteínas sin plegar en el ER (**Fig. 11.20**). La activación de la vía de respuesta a las proteínas no plegadas da lugar a la expansión del RE y la producción de más chaperonas para satisfacer el aumento de la demanda de plegamiento de proteínas, así como a una reducción transitoria de la cantidad de proteínas sintetizadas *de novo* que llegan al RE. Si estas modificaciones son insuficientes para reajustar el plegamiento de proteínas en el RE hasta un nivel normal, la actividad mantenida de la respuesta a las proteínas no plegadas conduce a la muerte celular programada (véase capítulo 18), eliminándose así del organismo las células que son incapaces de plegar correctamente sus proteínas.

En las células de mamíferos, la respuesta a las proteínas no plegadas se debe a la activación de tres moléculas señalizadoras o sensores de estrés en la membrana del RE (IRE1, ATF6 y PERK), que son activadas por proteínas sin plegar en la luz del RE (véase Fig. 11.20). La activación de IRE1 (el único sensor en las levaduras) resulta en la escisión y activación del ARNm que codifica un factor de transcripción denominado XBP1 en la cara citosólica de la membrana del RE. A continuación, el factor de transcripción XBP1 induce la expresión de los genes implicados en la respuesta a las proteínas no plegadas, como chaperonas, enzimas de la síntesis de lípidos, y proteínas de la ERAD. El segundo sensor, ATF6, es ya un factor de transcripción, retenido en la membrana del RE en células no sometidas a estrés. Las proteínas sin plegar en el RE señalan el transporte de ATF6 al aparato de Golgi, donde es escindido para liberar su forma activa al citosol. Entonces, ATF6 se desplaza al núcleo e induce la expresión de más genes de respuesta a proteínas no plegadas. El tercer sensor, PERK, es una proteína-cinasa que fosforila e inhibe el factor de iniciación de la traducción eIF2 (véase Fig. 9.21). Esto da lugar a una reducción global de la síntesis de proteínas y una disminución de la carga de proteínas no plegadas que llegan al RE. Además, la inhibición de eIF2 conduce a la traducción preferencial de ciertos ARNm. Como resultado, la activación de PERK da lugar a una mayor expresión de un factor de transcripción ATF4, que contribuye aún más a la inducción de los genes implicados en la respuesta a proteínas no plegadas.

RE liso y síntesis de lípidos

Además de su actividad en el procesamiento de las proteínas secretadas y de membrana, el RE es el sitio principal en el que se sintetizan los lípidos de la membrana en las células eucariotas. Puesto que son extremadamente hidrófobos, los lípidos se sintetizan asociados con membranas celulares ya existentes, en lugar de hacerlo en el ambiente acuoso del citosol. Aunque algunos lípidos se sintetizan asociados con otras membranas, la mayoría se sintetizan en el RE y son transportados, en vesículas o mediante proteínas transportadoras.

Como se comentó en el Capítulo 2, las membranas de las células eucariotas están compuestas por tres tipos fundamentales de lípidos: fosfolípi-

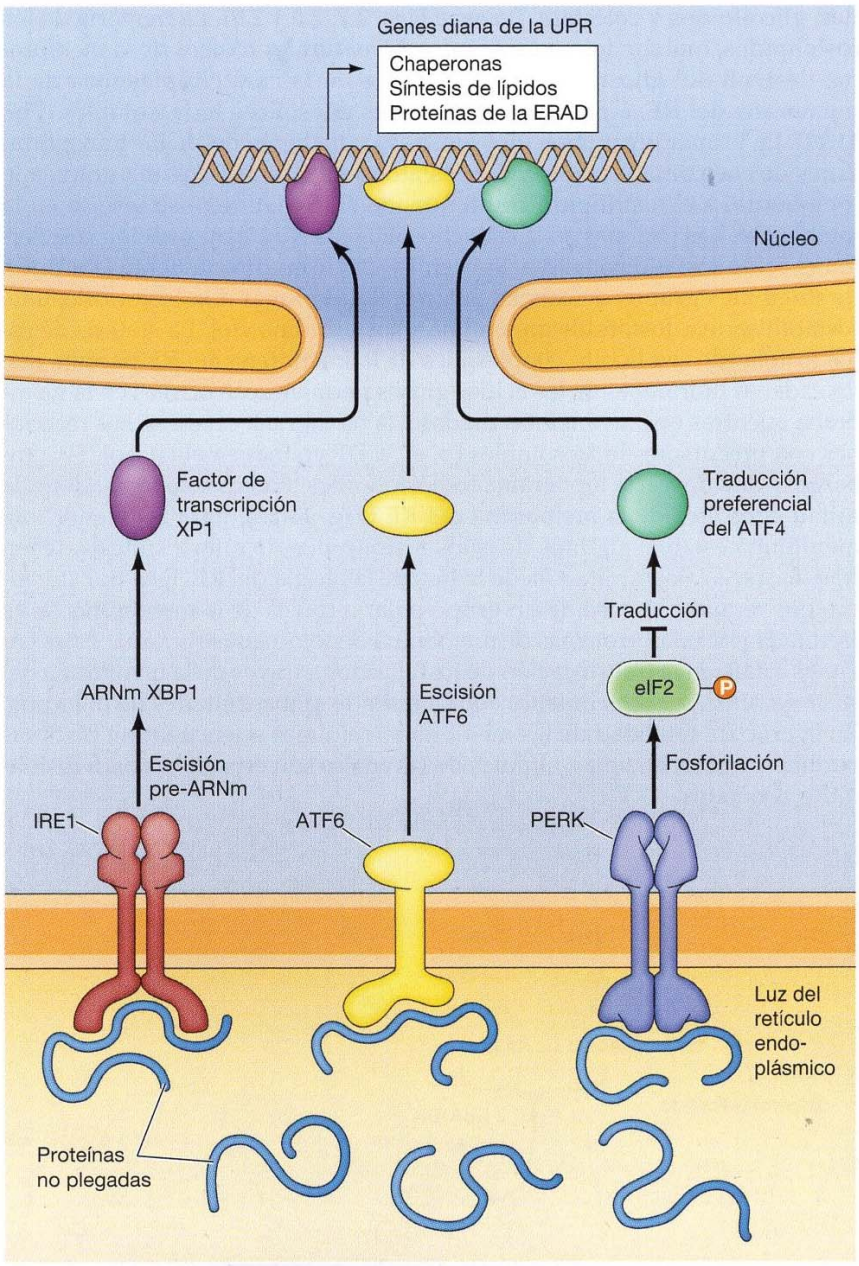


FIGURA 11.20 Respuesta a las proteínas no plegadas (UPR). Las proteínas no plegadas activan tres receptores en la membrana del RE. El primero, IRE1, escinde el pre-ARNm de un factor de transcripción (XBP1). Esto da lugar a la síntesis de XBP1, que se transloca al núcleo y estimula la transcripción de los genes diana de la UPR. El segundo receptor, ATF6, es escindido para liberar el factor de transcripción ATF6 activo. El tercer receptor, PERK, es una proteína-cinasa que fosforila el factor de traducción eIF2. Esto inhibe la traducción global, reduciendo la cantidad de proteínas que llegan al RE. También resulta en la traducción preferencial del factor de transcripción ATF4, que contribuye asimismo a la inducción de los genes dianas de la UPR codificando chaperonas, enzimas implicadas en la síntesis de lípidos y proteínas de la ERAD.

dos, glicolípidos y colesterol (véanse Figs. 2.7, 2.8 y 2.9). La mayoría de los fosfolípidos, que son los componentes estructurales básicos de la membrana, derivan del glicerol. Son sintetizados en la cara citoplásmica de la membrana del RE, a partir de precursores citosólicos hidrosolubles (**Fig. 11.21**). En primer lugar los ácidos grasos se transfieren desde los transportadores de coenzima A al glicerol-3-fosfato mediante una enzima unida a la membrana, y el fosfolípido resultante (ácido fosfatídico) se inserta en la membrana. Las enzimas en la cara citosólica del RE a continuación convierten el ácido fosfatídico en diacilglicerol y catalizan directamente la adición de diferentes grupos de cabeza polares, dando lugar a la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. La síntesis de estos fosfolípidos en la cara citoplásmica de la membrana del RE permite que las cadenas hidrófobas de los ácidos grasos permanezcan ocultas en la membrana mientras que las enzimas unidas a la membrana catalizan sus reacciones con precursores hidrosolubles (p. ej., CDP-colina) en el citosol. Sin embargo, y debido a esta topografía, los fosfolípidos nuevos sólo se añaden a la mitad citosólica de la membrana del RE (**Fig. 11.22**). Para mantener una membrana estable, algunos de estos fosfolípidos de nueva síntesis deben transferirse a la otra mitad (la de la luz) de la bicapa del RE. Esta transferencia, que requiere el paso de un grupo polar a través de la membrana, se ve facilitada por unas proteínas de membrana denominadas **flipasas.** Estas enzimas catalizan la translocación de fosfolípidos a través de la membrana del RE y garantizan el crecimiento equilibrado de ambas mitades de la bicapa. En la práctica totalidad de las membranas celulares se encuentran distintas familias de estas enzimas, algunas de las cuales son específicas para fosfolípidos concretos.

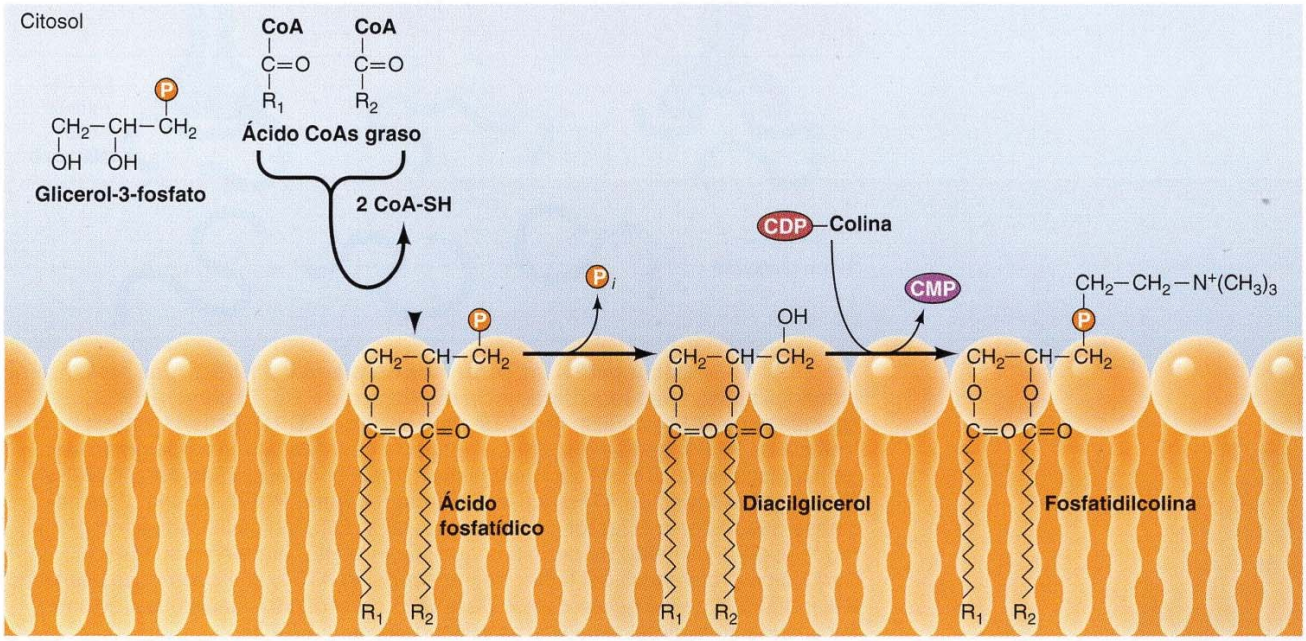


FIGURA 11.21 Síntesis de fosfolípidos. Los glicerofosfolípidos se sintetizan en la membrana del RE a partir de precursores citosólicos. En primer lugar dos ácidos grasos unidos a los transportadores de coenzima A (CoA) se unen al glicerol-3-fosfato, dando lugar al ácido fosfatídico, que simultáneamente se inserta en la membrana. A continuación una fosfatasa convierte el ácido fosfatídico en diacilglicerol, que se convierte en fosfatidilcolina por adición de un grupo de cabeza de fosfocolina polar fosfatidilinositol.

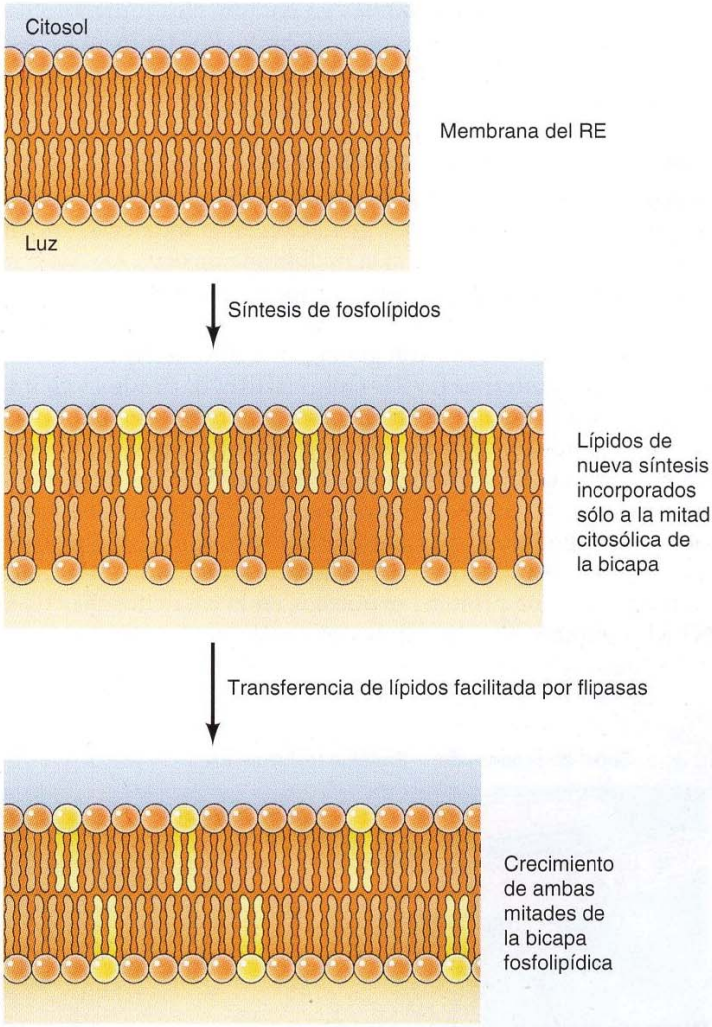


FIGURA 11.22 Translocación de los fosfolípidos a través de la membrana del RE. Puesto que los fosfolípidos se sintetizan en la cara citosólica de la membrana del RE, sólo se añaden a la mitad citosólica de la bicapa. Posteriormente, se translocan a través de la membrana mediante flipasas fosfolipídicas, dando lugar a un crecimiento uniforme de las dos mitades de la bicapa fosfolipídica.

Además de su papel en la síntesis de los glicerofosfolípidos, el RE también es el lugar principal de la síntesis de otros dos lípidos de membrana: colesterol y ceramida. Como se tratará posteriormente, la ceramida se convierte en glicolípidos o esfingomielina (el único fosfolípido de membrana que no deriva del glicerol) en el aparato de Golgi. Por tanto, el RE es el responsable de la síntesis de los productos finales o de los precursores de todos los lípidos principales de las membranas eucariotas.

El RE liso es abundante en las células que son particularmente activas en el metabolismo lipídico. Por ejemplo, las hormonas esteroideas se sintetizan (a partir del colesterol) en el RE, por lo que se encuentra una gran cantidad de RE liso en las células que producen esteroides, como las de los testículos y del ovario. Además, el RE liso es abundante en el hígado, donde contiene enzimas que metabolizan varios compuestos liposolubles. Estas enzimas desintoxicantes inactivan un número importante de drogas potencialmente

nocivas (p. ej., fenobarbital), convirtiéndolas en compuestos hidrosolubles que pueden eliminarse del cuerpo a través de la orina. Por tanto, el RE liso está implicado en múltiples aspectos del metabolismo de los lípidos y de los compuestos liposolubles.

Exportación de proteínas y lípidos desde el RE

Tanto las proteínas como los lípidos migran a través de la vía secretora en vesículas de transporte, que se originan por gemación en la membrana de un orgánulo y se funden posteriormente con la membrana de otro. Así, las moléculas son exportadas desde el RE en vesículas que experimentan gemación a partir de una región especializada del RE denominada sitio de salida del RE, o SSRE (**Fig. 11.23**). Las vesículas con gemación del RE se fusionan para formar el compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG), desde el cual la mercancía es transportada al Golgi. En cada caso, las proteínas en la luz de un orgánulo se empaquetan en una vesícula de transporte que se va a escindir por gemación, y después se liberan en la luz del orgánulo receptor tras la fusión de la vesícula. Las proteínas de membrana y los lípidos se transportan de forma similar, y es digno de mencionar que su orientación topológica se mantiene al viajar desde un orgánulo rodeado por membrana a otro. Por ejemplo, los dominios de una proteína expuestos en la cara citosólica de la membrana del RE también estarán expuestos en la cara citosólica de las

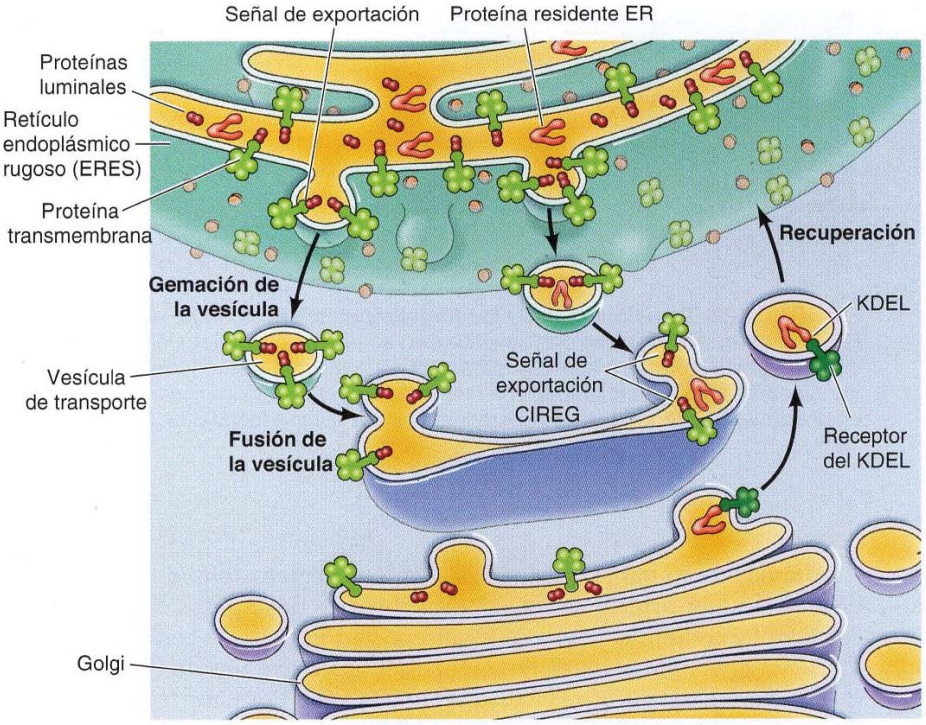


FIGURA 11.23 Transporte de vesículas desde el RE hasta el Golgi. Las proteínas y los lípidos se transportan desde el RE hasta el Golgi en vesículas de transporte que se originan por gemación de RE, sitios de salida (SSRE) y después se fusionan para formar las vesículas y los túbulos del compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG). Las proteínas luminales del RE direccionadas por el Golgi se unen por proteínas transmembrana que se empaquetan selectivamente en vesículas. Las proteínas del RE residentes destinadas a permanecer en la luz del RE son marcadas por secuencias de recuperación KDEL en su extremo carboxilo. Si estas proteínas son exportadas desde el RE al Golgi, son reconocidas por un receptor de reciclaje en el CIREG o el aparato de Golgi y devueltas selectivamente al RE.

membranas del Golgi y plasmática, mientras que los dominios de una proteína expuestos en la cara luminal de la membrana del RE estarán expuestos en la cara luminal del Golgi y al exterior de la célula (véase Fig. 11.11).

Las proteínas transmembrana direccionadas para el transporte desde el RE al Golgi tienen distintas señales de péptidos y carbohidratos que dirigen su empaquetamiento eficiente en vesículas de transporte en sitios de salida RE. Análogamente, la mayor parte de las proteínas luminales que son exportadas desde el RE están unidas a proteínas transmembrana que se empaquetan selectivamente en vesículas (véase Fig. 11.23). Las proteínas luminales ligadas son liberadas después en el compartimento intermedio RE-Golgi o Golgi.

Las proteínas no marcadas en el RE también pueden empaquetarse en vesículas y ser transportadas al Golgi por una vía por defecto, que no necesita señales específicas para el empaquetamiento de dichas proteínas. Así, no sólo las proteínas destinadas para su exportación, sino también las que funcionan dentro del RE (incluidas las luminales, como BiP, proteína disulfuro isomerasa y otras enzimas indicadas antes) pueden empaquetarse en vesículas de transporte y ser exportadas al aparato de Golgi. Si se dejara que estas proteínas avanzaran a lo largo de la vía secretora, se perderían para la célula. Para evitarlo, estas proteínas del RE residentes son reconocidas en el compartimento intermedio RE-Golgi o Golgi y transportadas de nuevo al RE por una vía de recuperación (véase Fig. 11.23). Por ejemplo, muchas proteínas que actúan en el RE (p. ej., BiP) tienen una secuencia diana Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL, en el código de una letra) en su extremo carboxilo terminal que dirige su recuperación hacia el RE. Si se deleciona esta secuencia en una proteína que normalmente funciona en el RE (por ejemplo, BiP o disulfuro proteína isomerasa), la proteína mutada es transportada al Golgi y secretada al exterior celular. Por el contrario, la adición de la secuencia KDEL al extremo carboxilo terminal de las proteínas que normalmente son secretadas hace que sean retenidas en el RE. La retención de algunas proteínas transmembrana en el RE está dictada de una manera similar por secuencias C-terminales cortas que contienen dos residuos de lisina (secuencias KKXX). Las proteínas que transportan las secuencias KDEL y KKXX se unen a receptores de reciclaje específicos en las membranas del compartimento intermedio RE-Golgi o el complejo de Golgi, se empaquetan en vesículas y son devueltas al RE.

Aparato de Golgi

El **aparato de Golgi, o el complejo de Golgi,** funciona como una fábrica en la que las proteínas recibidas desde el RE se reprocesan y distribuyen para ser transportadas a sus destinos finales: los lisosomas, la membrana plasmática o la secreción. Además, como ya se ha mencionado, los glicolípidos y la esfingomielina son sintetizados en el Golgi. En las células vegetales, el aparato de Golgi, además, es el sitio en el que se sintetizan los polisacáridos complejos de la pared celular. Así, el aparato de Golgi está implicado en procesar el amplio espectro de constituyentes celulares que viajan a lo largo de la vía secretora.

Organización del Golgi

En la mayoría de las células, el Golgi está compuesto por unas bolsas aplanadas, rodeadas de membrana (cisternas) y por vesículas asociadas (**Fig. 11.24**). Un aspecto llamativo del aparato de Golgi es su polaridad tanto en la estructura como en la función. Las proteínas procedentes del RE entran por su cara *cis* convexa (cara de entrada), y habitualmente se orienta hacia el núcleo. Entonces son transportadas a través del Golgi y salen por su cara cóncava *trans*

(cara de salida). Según atraviesan el Golgi, las proteínas se modifican y se distribuyen para el transporte a sus destinos finales en la célula.

El aparato de Golgi consta de un gran número de compartimentos discretos, por lo que habitualmente se divide en cuatro regiones funcionales diferentes: los compartimentos ***cis***, **medio** y ***trans*** y la **red *trans*-Golgi** (véase Fig. 11.24). Los diferentes procesos de procesamiento y distribución tienen lugar en una secuencia ordenada en los diferentes compartimentos de Golgi. Las proteínas del compartimento intermedio RE-Golgi entran en el compartimento *cis* del aparato de Golgi, en la que comienzan las reacciones de modificación de proteínas, lípidos y polisacáridos. Posteriormente atraviesan los compartimentos medial y *trans* en los que son sometidos a nuevas modificaciones y migran a la red *trans* del Golgi, que actúa como un centro de organización y distribución que dirige el tráfico molecular hacia los endosomas, los lisosomas, la membrana plasmática o el exterior de la célula.

El mecanismo por el cual las proteínas se desplazan a través del aparato de Golgi ha sido un motivo persistente de controversia. Se han propuesto dos modelos generales, si bien las pruebas experimentales actuales no son concluyentes. En el *modelo de cisternas estables* (**Fig. 11.25A**), las proteínas son transportadas entre las cisternas de Golgi en vesículas de transporte. Las cisternas son estructuras estables, con las enzimas activas en cada cisterna de Golgi retenidas en esa cisterna o recicladas por una vía de recuperación si son transportadas fuera de la cisterna en la que actúan. En el modelo de *maduración de cisternas* alternativo (**Fig. 11.25B**), las proteínas son transportadas a través de compartimentos del Golgi dentro de las cisternas de Golgi,

ANIMACIÓN 11.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a11.2

La organizacion del Golgi. El aparato de Golgi está compuesto por sacos aplastados encerrados por membranas que reciben proteínas del RE, las procesan y las dirigen a sus eventuales destinos.

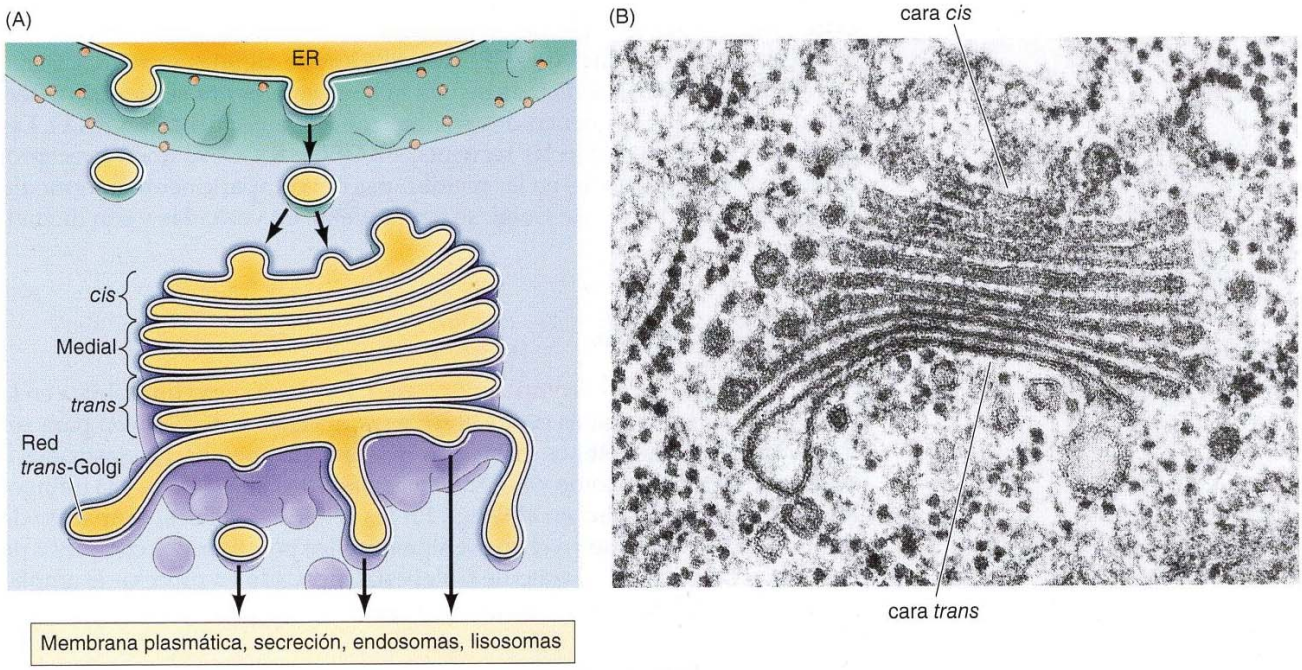


FIGURA 11.24 Microfotografía electrónica de un aparato de Golgi.
(A) El aparato de Golgi está constituido por una pila de cisternas aplanadas correspondientes a cuatro regiones: compartimentos *cis*, media y *trans* y la red *trans*-Golgi. Las proteínas y lípidos procedentes del RE entran en el aparato de Golgi por su cara *cis* y salen de la red *trans*-Golgi donde son clasificados para su transporte a la membrana plasmática, secreción, endosomas o lisosomas.
(B) Micrografía electrónica de un aparato de Golgi. (Cortesía del Dr. L. Andrew Staehelin, Universidad de Colorado en Boulder.)

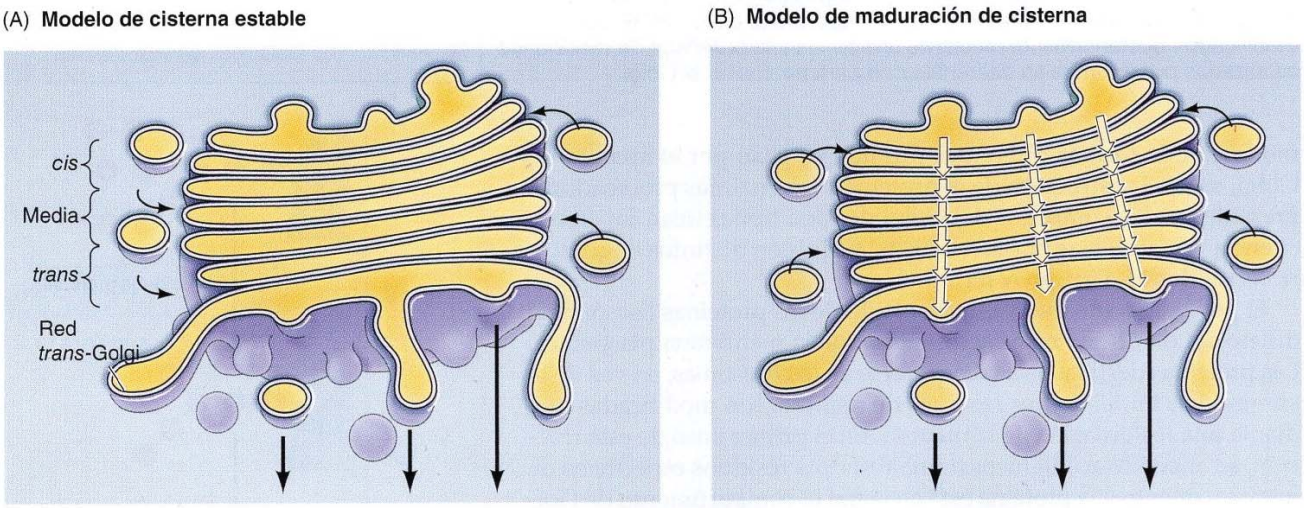


FIGURA 11.25 Transporte a través del Golgi. En el modelo de cisternas estables (A), las proteínas son transportadas en la dirección *cis-trans* en vesículas de transporte. En el modelo de maduración de las cisternas (B), las proteínas son transportadas a través del Golgi en la dirección *cis-trans* en las cisternas de Golgi, mientras maduran progresivamente y se desplazan a través del aparato de Golgi. En los dos modelos, las vesículas de transporte llevan también proteínas residentes en el Golgi de nuevo al compartimento anterior para su reutilización.

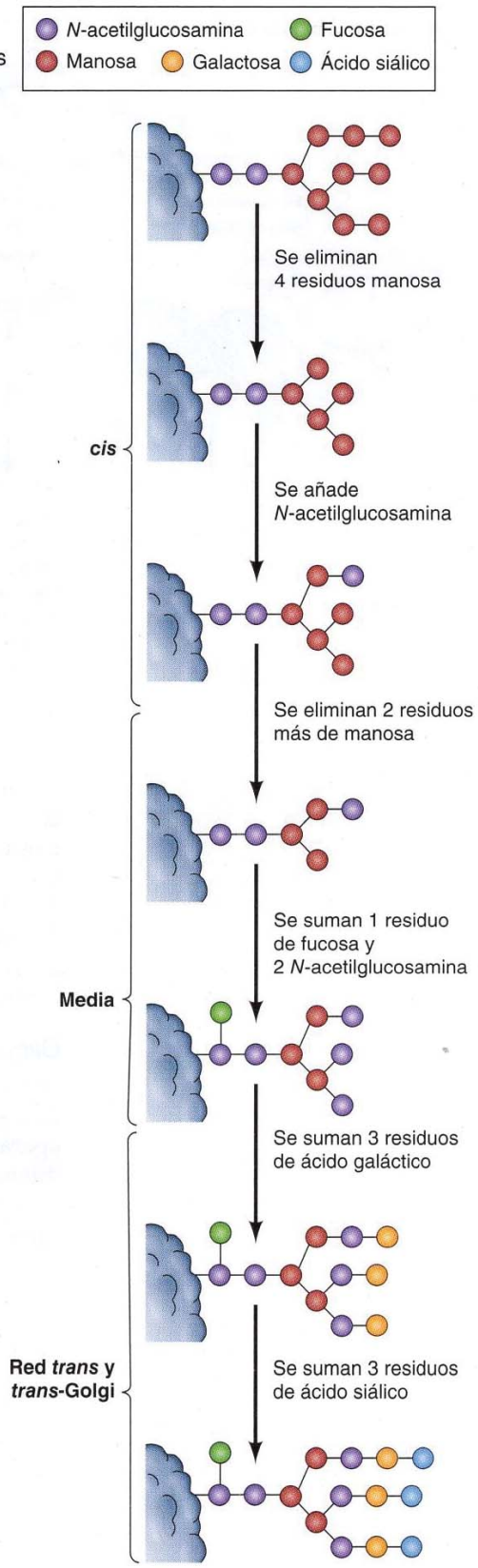
que maduran gradualmente y se mueven poco a poco a través del Golgi en la dirección *cis-trans*, y no en vesículas de transporte. En lugar de las proteínas de transporte a través del aparato de Golgi en la dirección *cis-trans*, las vesículas de transporte asociadas con el aparato de Golgi actúan para devolver las proteínas residentes del Golgi de nuevo al Golgi anterior. Estos dos modelos explican algunas de las características del transporte en el Golgi, aunque no todas, y se necesitan estudios adicionales para resolver la controvertida naturaleza del tráfico en el Golgi.

Glicosilación de proteínas en el Golgi

El procesamiento de proteínas en el Golgi implica una extensa modificación de las porciones de carbohidratos de las glicoproteínas. En los mamíferos, el aparato de Golgi contiene más de 250 enzimas que catalizan la adición de diferentes azúcares a las glicoproteínas. Estas enzimas están situadas en diferentes compartimentos del Golgi, de manera que el procesamiento de los carbohidratos tiene lugar de una forma ordenada a medida que la glicoproteína se desplaza a través del complejo de Golgi.

Uno de los aspectos principales de este procesamiento es la modificación de los *N*-oligosacáridos que se unieron a las proteínas en el RE. Como ya se ha tratado en este capítulo, las proteínas se modifican en el RE al añadírseles un oligosacárido constituido por 14 residuos de azúcar (véase Fig. 11.17). Se eliminan tres residuos de glucosa dentro del RE y los oligosacáridos de estas *N*-glucoproteínas se someten después a otras modificaciones sustanciales a medida que la proteína se desplaza a través del aparato de Golgi. En el ejemplo mostrado en la **Figura 11.26**, se eliminan los residuos de manosa y se añade *N*-acetilglicosamina en el compartimento de Golgi *cis*. Se eliminan residuos de manosa adicionales y se añade fucosa más residuos adicionales de *N*-acetilglicosamina en el Golgi medio, seguido por la adición de residuos de galactosa y ácido siálico en el compartimento *trans* y en la red *trans*-Golgi. Es importante reseñar que, las distintas glucoproteínas se

FIGURA 11.26 Procesamiento de los *N*-oligosacáridos en el Golgi. Los *N*-oligosacáridos de las glicoproteínas transportadas desde el RE son modificados posteriormente mediante una secuencia ordenada de reacciones catalizadas por enzimas en diferentes compartimentos en el Golgi.



modifican de formas diferentes durante su paso por el aparato de Golgi, según la estructura de la proteína y las enzimas procesadoras presentes en los complejos del Golgi de cada tipo celular. En consecuencia, las proteínas pueden salir del Golgi con distintos oligosacáridos unidos a su grupo *N* terminal.

El procesamiento del *N*-oligosacárido de las proteínas lisosómicas difiere del de las proteínas secretadas y de la membrana plasmática. Las proteínas destinadas a incorporarse en los lisosomas, en vez de la eliminación inicial de tres residuos de manosa, son modificadas mediante una fosforilación de la manosa. En el primer paso de esta reacción, se añade *N*-acetilglucosamina fosfato a residuos específicos de manosa, mientras la proteína está en la red el compartimento de Golgi *cis* (**Fig. 11.27**). A esto le sigue la eliminación del grupo *N*-acetilglucosamina, dejando residuos de **manosa-6-fosfato** en el *N*-oligosacárido. Debido a esta modificación, estos residuos no son eliminados durante el procesamiento posterior. En su lugar, el residuo de manosa fosforilado es reconocido específicamente por un receptor de manosa-6-fosfato en la red *trans* del Golgi, que dirige el transporte de estas proteínas a los lisosomas.

Por tanto, la fosforilación de los residuos de manosa es un paso crucial en la distribución de las proteínas lisosómicas hacia su destino intracelular correcto. La especifidad de este proceso reside en la enzima que cataliza el primer paso en la secuencia de la reacción —la adición selectiva de *N*-acetilglucosamina fosfato a las proteínas lisosómicas—. Esta enzima reconoce un determinante estructural que está presente en las proteínas lisosómicas pero no en las proteínas destinadas a la membrana plasmática o a la secreción. Este determinante de reconocimiento no es una simple secuencia de aminoácidos, sino que está constituido, en la proteína plegada, por la yuxtaposición de secuencias de aminoácidos de regiones diferentes de la cadena polipeptídica. A diferencia de las secuencias señal que dirigen la translocación de proteínas al RE, el determinante de reconocimiento que conduce a la fosforilación de la manosa —y que, por tanto, dirige finalmente las proteínas a los lisosomas—, depende de la conformación tridimensional de la proteína plegada. Estos determinantes se denominan **regiones señal**, a diferencia de las señales lineales tratadas previamente en este capítulo.

Las proteínas también pueden modificarse mediante la adición de carbohidratos a las cadenas laterales de residuos de serina y treonina que formen parte de secuencias específicas (*O*-glicosilación) (véase Fig. 9.32). Estas modificaciones ocurren en el aparato de Golgi por la adición secuencial de residuos de azúcar. Algunos oligosacáridos *O*-ligados consisten en sólo unos residuos de azúcares, mientras que otros son largas cadenas de muchos azúcares. Los proteoglicanos, proteínas secretadas que son componentes importantes de la matriz extracelular (abordada en el Capítulo 15), ofrecen un ejemplo de *O*-glicosilación extendida. Su procesamiento en el aparato de Golgi implica la adición de 100 o más cadenas de carbohidratos a un polipéptido, donde cada cadena está formada por hasta 100 residuos de azúcares que son modificados por la adición de grupos sulfato (**Fig. 11.28**).

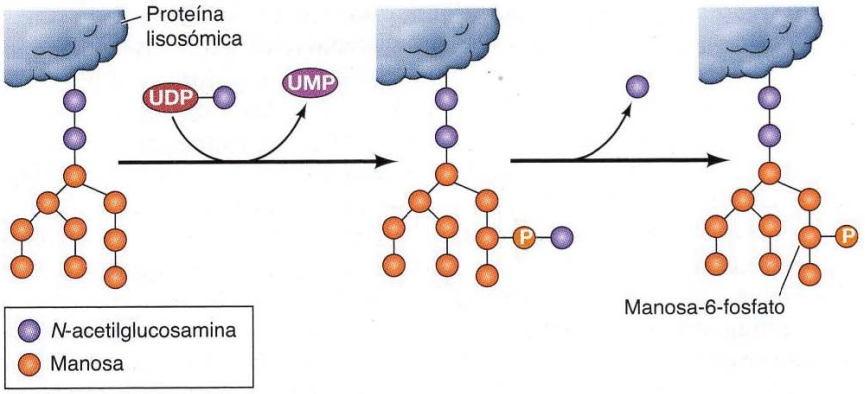


FIGURA 11.27 Marcaje y dirección de las proteínas lisosómicas mediante la fosforilación de los residuos de manosa. Las proteínas destinadas a incorporarse en los lisosomas son reconocidas y modificadas específicamente mediante la adición de grupos fosfato a la posición 6 de los residuos de manosa. En el primer paso de la reacción, los fosfatos de *N*-acetilglucosamina se transfieren a los residuos de manosa desde la UDP-*N* acetilglucosamina. A continuación se eliminan los grupos *N*-acetilglucosamina dando lugar a manosa-6-fosfato.

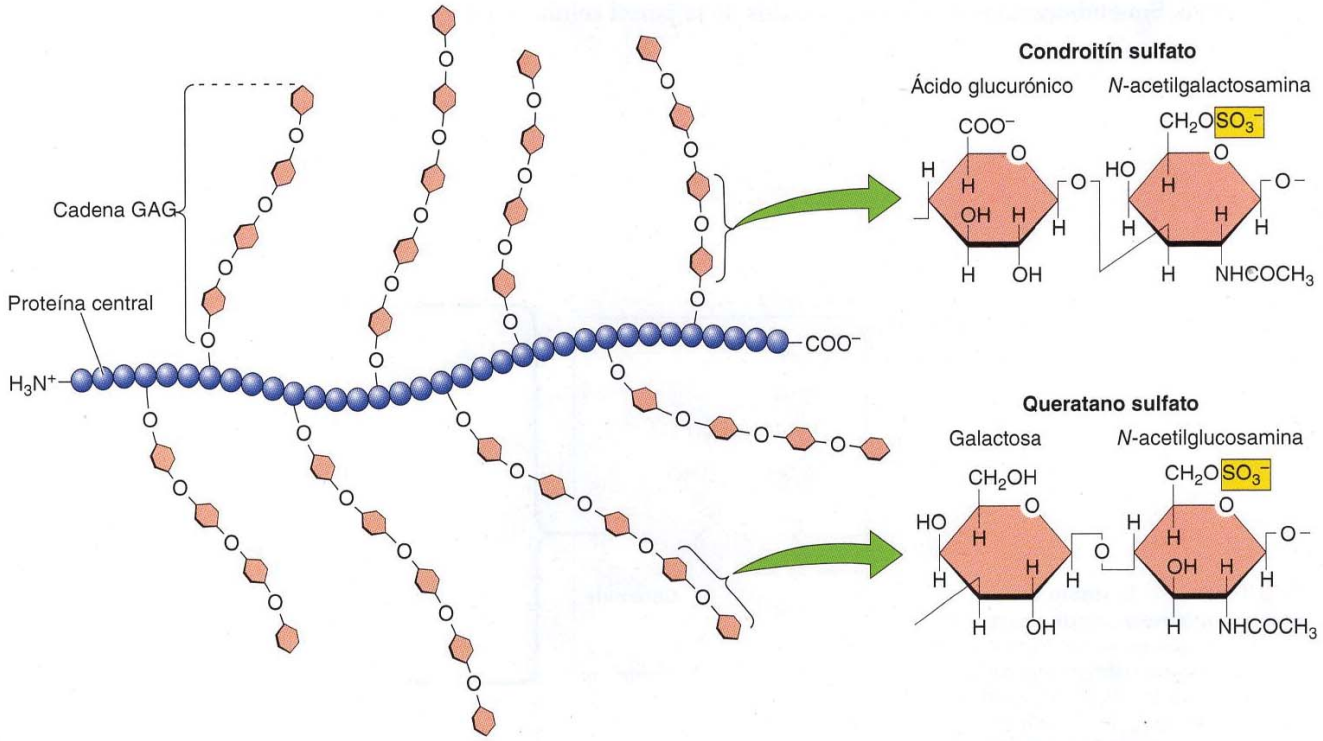


FIGURA 11.28 Estructura de un proteoglicano. Los proteoglicanos contienen largas cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), que son disacáridos de repetición (p. ej., controitín sulfato y queratano sulfato), unidos a una proteína central. Cada GAG contiene hasta 100 residuos de azúcares y en una proteína central puede haber ligados hasta 100 GAG.

Metabolismo de lípidos y de polisacáridos en el Golgi

Además de procesar y distribuir las glicoproteínas, el aparato de Golgi participa en el metabolismo lipídico —concretamente, en la síntesis de glicolípidos y esfingomielina—. Como ya se ha visto, los glicerofosfolípidos, el colesterol y la ceramida se sintetizan en el RE. La esfingomielina y los glicolípidos se sintetizan a partir de la ceramida en el aparato de Golgi (**Fig. 11.29**). La esfingomielina (el único fosfolípido no glicérico en las membranas celulares) es sintetizada por la transferencia de un grupo fosforilcolina desde la fosfatidilcolina a la ceramida. Alternativamente, la adición de carbohidratos a la ceramida puede dar lugar a diferentes glicolípidos.

La esfingomielina se sintetiza en la superficie luminal del Golgi, pero la glucosa se añade a la ceramida en la cara citosólica. Sin embargo, parece ser que la glucosilceramida se da la vuelta y los carbohidratos adicionales se añaden en la cara luminal de la membrana. Los glicolípidos no son capaces de translocarse a través de la membrana del Golgi, así que se encuentran solo en la mitad luminal de la bicapa del Golgi como la mayoría de la esfingomielina. Tras el transporte vesicular, se localizan en la cara externa de la membrana citoplasmática, con sus grupos de cabeza polares expuestos en la superficie celular. Como se verá en el Capítulo 14, los residuos de oligosacáridos de los glicolípidos son marcadores de superficie importantes en el reconocimiento célula-célula.

En las células vegetales, el aparato de Golgi tiene la función añadida de ser el lugar donde se sintetizan los polisacáridos complejos de la pared celular. Como se tratará con mayor detalle en el Capítulo 15, la pared celular vegetal está compuesta por tres tipos principales de polisacáridos. La celulosa, el constituyente predominante, es un polímero lineal de restos de glucosa. Es sintetizado en la superficie celular por enzimas de la membrana plasmática. Sin embargo, los otros polisacáridos de la pared celular (hemi-

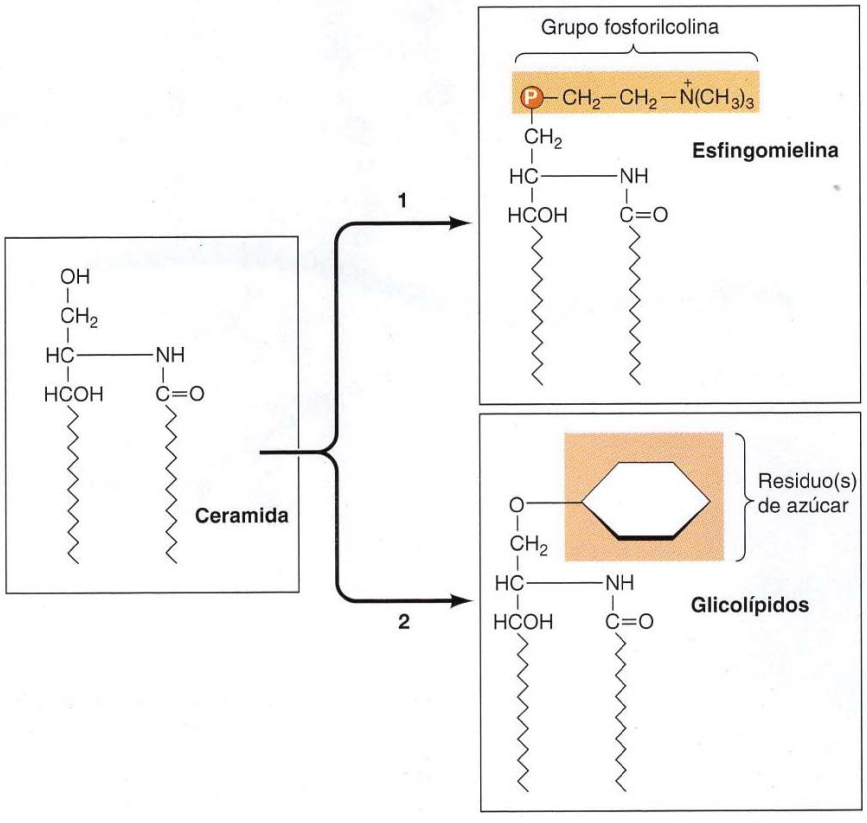


FIGURA 11.29 Síntesis de esfingomielina y glicolípidos. La ceramida, que es sintetizada en el RE, se convierte en esfingomielina (un fosfolípido) o en glicolípidos en el aparato de Golgi. En la primera reacción, un grupo fosforilcolina se transfiere desde la fosfatidilcolina a la ceramida. Alternativamente, se pueden sintetizar diferentes glicolípidos añadiéndose uno o más residuos de azúcar (p. ej., glucosa).

celulosas y pectinas) son moléculas complejas de cadena ramificada que se sintetizan en el aparato de Golgi y que son transportadas posteriormente en vesículas a la superficie celular. La síntesis de estos polisacáridos de la pared celular es una función principal de la célula, y hasta el 80% de la actividad metabólica del aparato de Golgi en las células vegetales se dedica a la síntesis de polisacáridos.

Distribución y exportación de proteínas desde el aparato de Golgi

Las proteínas, al igual que los lípidos y los polisacáridos, son transportadas desde el aparato de Golgi a sus destinos finales a través de la vía secretora. Esto implica que las proteínas se distribuyan en diferentes tipos de vesículas de transporte, las cuales saldrán por gemación desde la red *trans* del Golgi y llevarán su contenido hasta la localización celular adecuada. (**Fig. 11.30**). Algunas proteínas se transportan desde el Golgi a la membrana plasmática, ya sea directamente o a través de endosomas de reciclaje como un compartimento intermedio. Otras proteínas se secretan de la célula o bien se dirigen de manera específica a otros destinos celulares, como los lisosomas en las células animales o las vacuolas en las levaduras y plantas.

Las proteínas que actúan en el aparato de Golgi deben ser retenidas dentro de los compartimentos apropiados del orgánulo, en lugar de ser trans-

VÍDEO 11.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v11.2

Gemación desde el aparato de Golgi. Las vesículas de transporte experimentan gemación desde la red *trans*-Golgi y suministran su mercancía secretora a sus destinos.

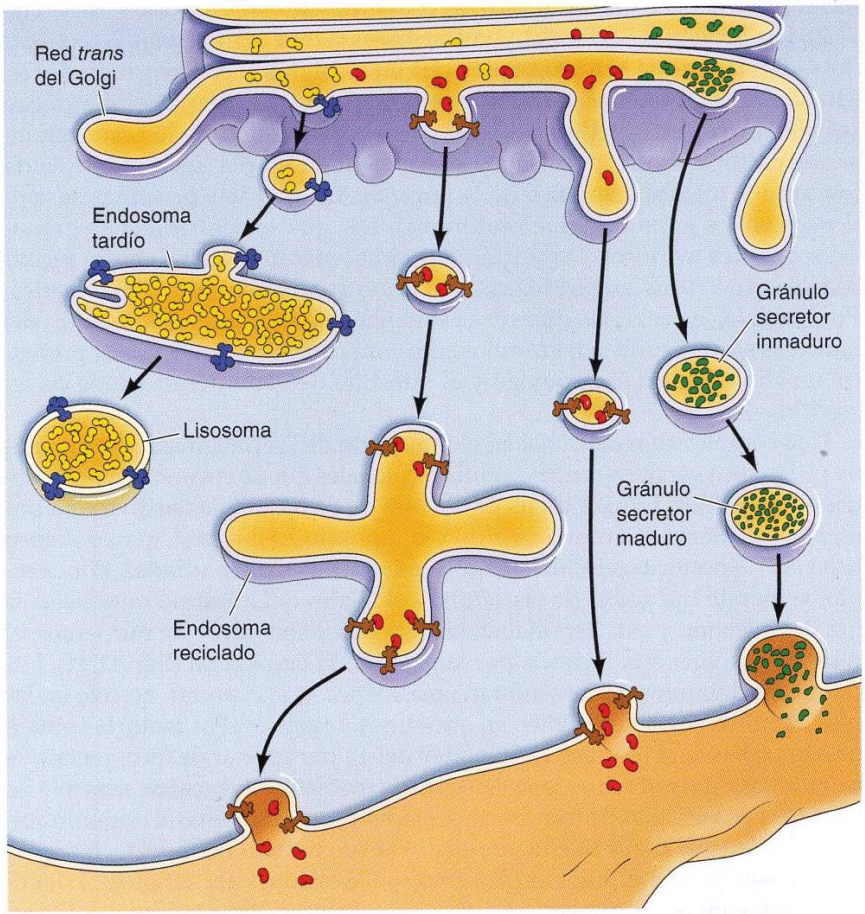


FIGURA 11.30 Transporte desde el aparato de Golgi. Las proteínas se distribuyen en la red *trans* del Golgi y se transportan en vesículas a sus destinos finales. Las proteínas se transportan a la membrana plasmática directamente o bien a través de endosomas de reciclaje. Por otra parte, las proteínas se distribuyen en distintos gránulos secretores de secreción regulada. Asimismo, pueden dirigirse hacia los endosomas tardíos que darán lugar a lisosomas.

portadas a lo largo de la vía secretora. La mayor parte de las proteínas Golgi residentes son proteínas transmembrana que actúan en glicosilación y son retenidas dentro del Golgi por señales en su membrana en extensión y en los dominios citoplásmicos. Además, al igual que las proteínas residentes del RE, las señales en algunas proteínas Golgi median en su recuperación desde posteriores compartimentos a lo largo de la vía secretora, lo que incluye el transporte de nuevo de los endosomas a la red *trans*-Golgi.

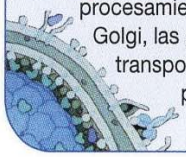
El transporte desde el aparato de Golgi hacia la superficie celular puede darse a través de, al menos, tres vías (véase Fig. 11.30). La más simple es el transporte directo desde la red Golgi *trans* a la membrana plasmática, que da lugar a la secreción continua de proteínas celulares, así como la incorporación de proteínas y lípidos a la membrana plasmática. Por otra parte, las proteínas pueden migrar del Golgi hacia la membrana plasmática a través de endosomas de reciclaje que actúan como intermediarios y representan uno de los tres tipos de endosomas caracterizados en las células animales (como se tratará en una sección ulterior de este capítulo).

Algunas células poseen una vía secretora regulada diferente de secreción de proteínas específicas como respuesta a señales ambientales (véase Fig. 11.30). Algunos ejemplos de ella serían la liberación de hormonas por parte de células endocrinas, la liberación de neurotransmisor por parte de las neuronas y la liberación de enzimas digestivas por parte de las células acinares pancreáticas que se abordó al comienzo de este capítulo (véase Fig. 11.2). Las proteínas se distribuyen a la vía secretora regulada en la red *trans* del Golgi en la que son empaquetadas en gránulos secretores inmaduros. Muchas de las proteínas que son clasificadas en estos gránulos se agregan selectivamente en la red *trans*-Golgi como consecuencia de las características estructurales que impulsan la agregación en un pH ligeramente ácido (en torno a 6,4) característico de la red *trans*-Golgi. Estas proteínas se condensan en los gránulos secretores inmaduros, que se desarrollan en gránulos secretores maduros. Estos gránulos almacenarán proteínas hasta recibir señales específicas que induzcan su fusión con la membrana plasmática. Por ejemplo, las enzimas digestivas sintetizadas por las células acinares del páncreas se almacenan en gránulos secretoras maduras hasta que la presencia de alimentos en el estómago y el intestino delgado desencadene su secreción.

VÍDEO 11.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v11.3

Transporte post-Golgi. Después del procesamiento en el aparato de Golgi, las proteínas son transportadas a la membrana plasmática.



Una complicación adicional en el transporte de las proteínas a la membrana plasmática surge en muchas células epiteliales que se encuentran polarizadas en los tejidos. La membrana plasmática de dichas células se divide en dos regiones distintas, el **dominio apical** y el **dominio basolateral,** que contienen proteínas específicas relacionadas con sus funciones diferenciadas. Por ejemplo, la membrana apical de las células epiteliales del intestino mira hacia la luz del intestino y está especializada en la absorción eficaz de nutrientes; el resto de la célula está rodeada por la membrana basolateral (**Fig. 11.31**). Los diferentes dominios de la membrana plasmática se encuentran no sólo en las células epiteliales, sino también en otros tipos de células. Por tanto, las proteínas que salen de la red *trans* del Golgi se deben transportar de forma selectiva a dominios diferentes, lo que se lleva a cabo mediante el embalaje selectivo de proteínas en vesículas de transporte dirigidas específicamente al dominio apical o basolateral, lo que puede producirse tanto en la red *trans* del Golgi como en endosomas de reciclaje. Las proteínas son marcadas para dirigirse al dominio basolateral mediante secuencias cortas de aminoácidos, como grupos hidrófobos que contienen dileucina (LL) o tirosina, en el interior de sus dominios citoplásmicos. Aún no conocemos del todo la distribución de proteínas a los dominios apicales, pero parece estar mediada por señales directoras consistentes en modificaciones de anclajes GPI (véase Fig. 11.18) e hidratos de carbono, en vez de secuencias de aminoácidos.

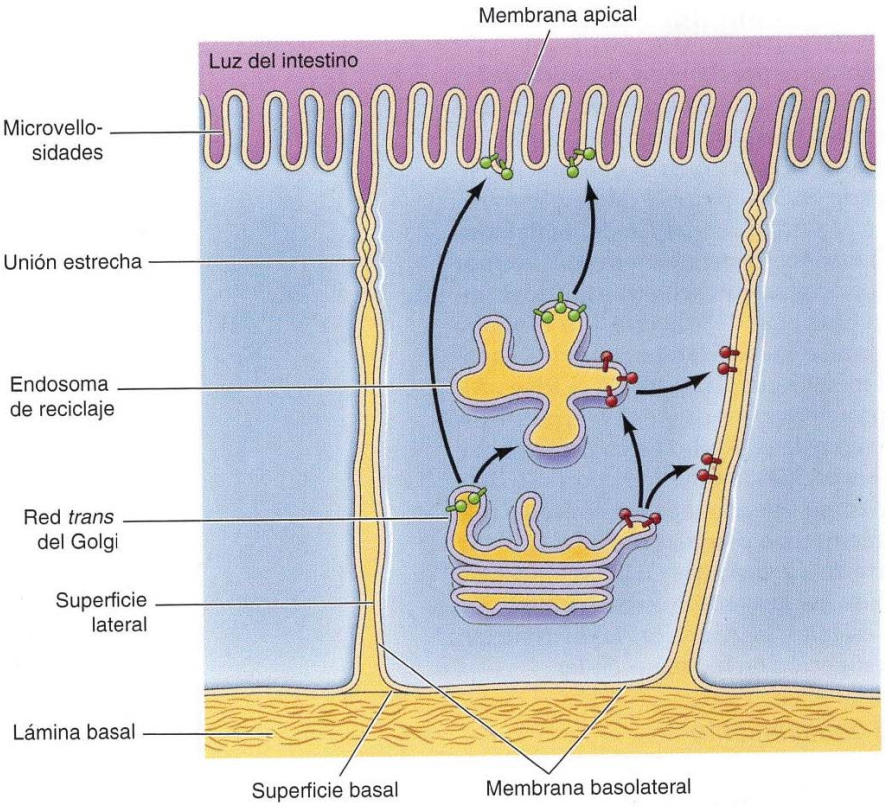


FIGURA 11.31 Transporte a la membrana plasmática de las células polarizadas. La membrana plasmática de las células epiteliales polarizadas se divide en los dominios apical y basolateral. En este ejemplo (epitelio intestinal), la superficie apical de la célula mira hacia la luz del intestino, las superficies laterales están en contacto con las células adyacentes y la superficie basal se apoya en una capa de matriz extracelular (la lámina basal). La membrana apical se caracteriza por la presencia de microvellosidades, que facilitan la absorción de los nutrientes al aumentar la superficie. Las proteínas específicas son dirigidas a la membrana apical o a la membrana basolateral en la red *trans* del Golgi. Las uniones estrechas entre las células adyacentes mantienen la identidad de las membranas apical y basolateral, al impedir la difusión de las proteínas entre estos dominios.

La vía de distribución de proteínas mejor caracterizada en el Golgi es el transporte selectivo hacia los lisosomas. Como ya se ha visto, las proteínas cuyo destino es el interior de los lisosomas están marcadas con manosa-6-fosfato, que se origina por la modificación de sus *N*-oligosacáridos al poco tiempo de entrar en el aparato de Golgi (véase Fig. 11.27). Los receptores de transmembrana en la *trans* del Golgi reconoce estos residuos de manosa-6-fosfato. Los receptores contienen secuencias en sus dominios citosólicos que dirigen el empaquetamiento de los complejos de enzimas lisosómicas receptoras en vesículas de transporte destinadas a endosomas tardíos, que maduran posteriormente en lisosomas.

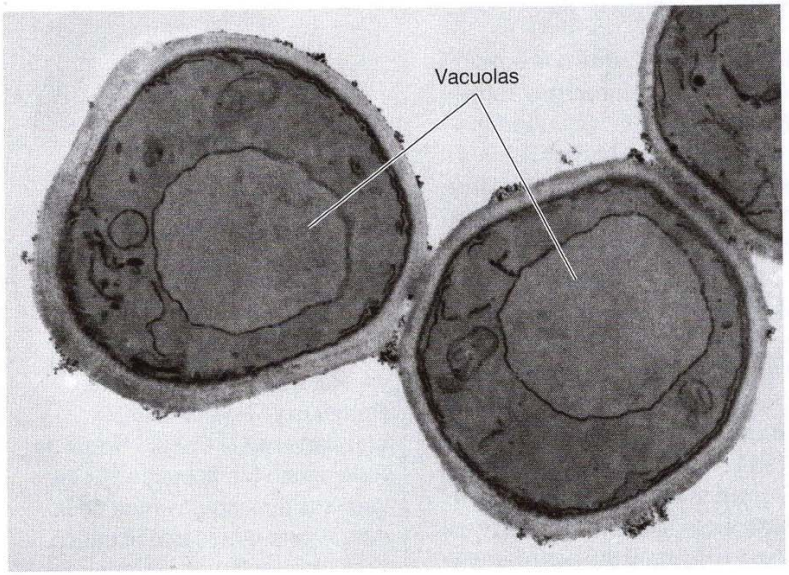


FIGURA 11.32 Vacuola en una levadura. La vacuola sirve de lisosoma en las levaduras.

En las levaduras y en las células vegetales, que carecen de lisosomas, las proteínas son transportadas desde el aparato de Golgi hacia un destino adicional: **la vacuola** (**Fig. 11.32**). En estas células, las vacuolas asumen la función de los lisosomas además de realizar otros cometidos, como el almacenamiento de nutrientes y el mantenimiento de la presión de turgencia y del equilibrio osmótico. A diferencia de las proteínas destinadas a los lisosomas, las proteínas se destinan a las vacuolas mediante secuencias peptídicas cortas en lugar de a través de señales de carbohidratos.

Mecanismo de transporte de las vesículas

Las vesículas de transporte desempeñan un papel clave en el tráfico de las moléculas entre los diferentes compartimentos rodeados de membrana que integran la vía secretora. Como se comentará en una sección posterior de este capítulo y en el Capítulo 14, las vesículas desempeñan una función similar en el transporte de material captado en la superficie celular. El transporte de las vesículas es, por tanto, una actividad celular fundamental, responsable del tráfico molecular entre diversos compartimentos rodeados por membrana, específicos. Por tanto, la selectividad de dicho transporte resulta clave para mantener la organización funcional de la célula. Por ejemplo, las enzimas lisosómicas deben transportarse específicamente desde el aparato de Golgi a los lisosomas —no a la membrana plasmática o al RE—. Algunas de las señales que dirigen las proteínas a los orgánulos específicos, como los lisosomas, ya se han tratado en este capítulo. Estas proteínas se transportan en vesículas, por lo que la especificidad del transporte se basa en el empaquetamiento selectivo de la carga seleccionada en vesículas que reconozcan y se fusionen sólo con la membrana diana apropiada. Dada la gran importancia que tiene el transporte de las vesículas en la organización de la célula eucariota, el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan el empaquetamiento de las vesículas, la gemación, la distribución y la fusión es un área principal de investigación en biología celular.

Aproximaciones experimentales al conocimiento del transporte de las vesículas

Nuestros conocimientos básicos de los mecanismos moleculares del transporte vesicular provinieron de la convergencia de tres enfoques experimentales diferentes en distintos sistemas biológicos: (1) el aislamiento de mutantes de levaduras defectuosas en el transporte y distribución de las proteínas; (2) la reconstitución del transporte de vesículas en sistemas acelulares; (3) el análisis bioquímico de las vesículas sinápticas, que son las responsables de la secreción regulada de los neurotransmisores por las neuronas. Cada uno de estos sistemas experimentales tiene diferentes ventajas para el conocimiento de aspectos concretos del proceso de transporte, y su utilización experimental revela mecanismos moleculares semejantes que regulan el transporte vesicular en células tan distintas como las levaduras y las neuronas de los mamíferos.

Las levaduras son útiles para estudiar la vía secretora porque son susceptibles de poderse realizar un análisis genético. Concretamente, Randy Schekman y sus colaboradores, en 1980, han sido pioneros en el aislamiento de mutantes de levaduras defectuosos en el transporte vesicular. Estos incluyen mutantes defectuosos en varios pasos de la secreción proteica (mutantes *sec*), mutantes incapaces de transportar proteínas a la vacuola, y mutantes incapaces de retener las proteínas residentes en el RE. El aislamiento de tales mutantes en las levaduras condujo a la clonación molecular y al análisis de los genes correspondientes, identificándose varias proteínas implicadas en diversos pasos de la vía secretora.

Los estudios bioquímicos sobre el transporte vesicular utilizando sistemas reconstituidos han complementado estos estudios genéticos y han permitido aislar directamente proteínas de transporte en las células de mamíferos. El primer sistema de transporte acelular lo desarrolló en 1980 James Rothman y colaboradores, que analizaron el transporte de proteínas entre los compartimentos del aparato de Golgi. Se han desarrollado otros sistemas reconstituidos similares para analizar el transporte entre otros compartimentos, incluyendo el transporte desde el RE al Golgi y el transporte desde el Golgi a las vesículas de secreción, a las vacuolas y a la membrana plasmática. El desarro-

◆ Randy Schekman, James Rothman y Thomas Südhof compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2013 «por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico vesicular, un importante sistema de transporte de nuestras células».

llo de estos sistemas *in vitro* ha permitido realizar estudios bioquímicos del proceso de transporte y el análisis funcional de las proteínas identificadas mediante mutaciones en levaduras, así como el aislamiento directo de algunas de las proteínas implicadas en la gemación y la fusión de las vesículas.

Los estudios sobre la transmisión sináptica en las neuronas, que representa una forma altamente especializada de la secreción regulada, han revelado aspectos críticos de los mecanismos moleculares del transporte vesicular. Una sinapsis es la unión de una neurona con otra célula, que puede ser o bien otra neurona o un efector, como una célula muscular. La información se transmite a través de la sinapsis mediante neurotransmisores químicos, como la acetilcolina, que se almacenan en **vesículas sinápticas**. La estimulación de la neurona transmisora desencadena la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, lo que produce la liberación de los neurotransmisores y la estimulación de la neurona postsináptica o célula efectora. Las vesículas sinápticas son extremadamente abundantes en el cerebro, lo que permite que se puedan purificar en grandes cantidades para el análisis bioquímico. Estudios de las proteínas aisladas de las vesículas sinápticas en el laboratorio de Thomas Südhof, muchas de las cuales están estrechamente relacionadas con las proteínas, que se mostró que desempeñan un papel crítico en el transporte de las vesículas, ha revelado aspectos críticos del mecanismo molecular de la fusión de las vesículas.

Nuestros conocimientos del transporte vesicular se han ampliado mediante estudios que empleaban proteínas de fusión con GFP han permitido visualizar vesículas de transporte que portan proteínas específicas para su visualización mediante inmunofluorescencia a medida que se mueven a través de la vía secretora (**Fig. 11.33**). En estos experimentos, las células eran transfectadas con construcciones de ADNc que codificaban para proteínas secretoras marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) (véase Fig. 1.28). El progreso de las proteínas marcadas con GFP a través de la vía secretora puede seguirse en células vivas, permitiendo la caracterización de diversos aspectos de la dinámica e interacciones moleculares implicadas en el transporte vesicular.

VÍDEO 11.4

sites.sinauer.com/cooper7e/v11.4

Tráfico vesicular. Las vesículas de transporte se mueven entre el RE, el Golgi y la membrana celular a lo largo de filamentos citoesqueléticos.

Selección de la mercancía, proteínas de la cubierta y gemación vesicular

La mayor parte de las vesículas de transporte que llevan proteínas desde el RE al Golgi y a los compartimentos posteriores están revestidas con proteínas de cubierta citosólicas y reciben, por tanto, el nombre de vesículas recu-

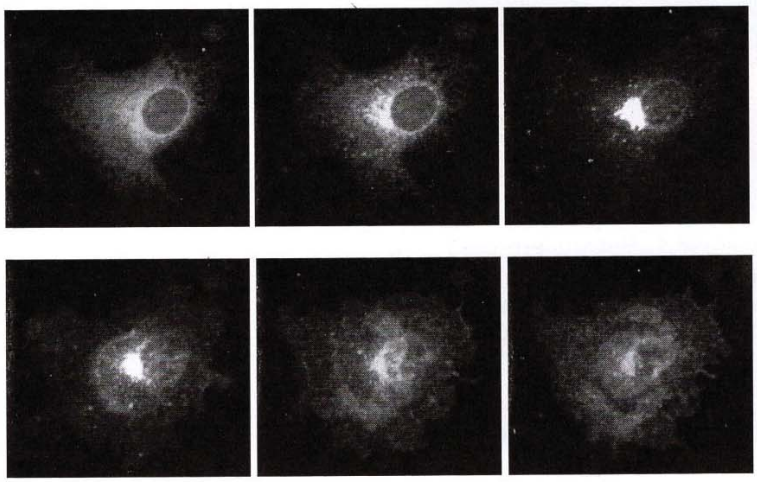


FIGURA 11.33 Visualización de vesículas de transporte en una célula viva. Secuencia temporal que muestra el movimiento de vesículas marcadas con GFP desde el RE al Golgi y desde el Golgi a la membrana plasmática. (Cortesía de Jennifer Lippincott-Schwartz).

biertas. El ensamblaje de las proteínas de cubierta impulsa la gemación de vesículas que contienen proteínas de mercancía seleccionadas de la membrana donante (**Fig. 11.34**). Las vesículas se desplazan a lo largo de filamentos citoesqueléticos hasta sus destinos, como se describe en el Capítulo 13. Las cubiertas se eliminan en la membrana de destino, lo que permite que las membranas se fusionen y las vesículas evacúen su mercancía luminal e inserten sus proteínas de membrana en la membrana de destino.

Se conocen tres familias de proteínas de cubierta de las vesículas: **clatrina, COPI** y **COPII** (COP indica proteína de la cubierta). Las vesículas recubiertas con estas proteínas intervienen en el transporte entre distintos compartimentos de la vía secretora (**Fig. 11.35**). Las **vesículas cubiertas de**

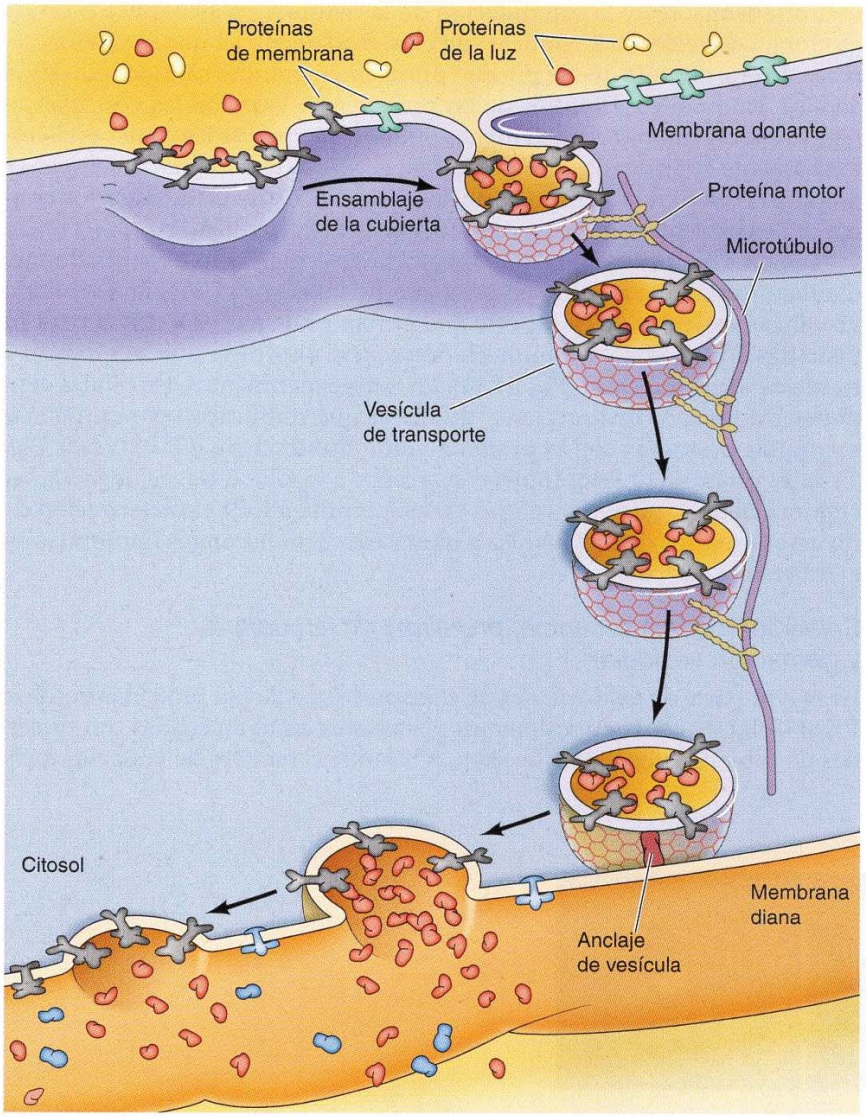


FIGURA 11.34 Formación y fusión de una vesícula de transporte. Las proteínas de membrana y las proteínas secretoras de la luz y sus receptores se recogen en ciertas regiones de una membrana donante en las que la formación de una cubierta citosólica dará lugar a la formación de una vesícula de transporte por gemación. La vesícula es transportada por proteínas motoras a lo largo de filamentos citoesqueléticos hasta su destino. La vesícula de transporte se fija entonces a su membrana de destino, se elimina la cubierta y la vesícula se fusiona con su destino.

COPII se encargan de transportar proteínas desde el RE al compartimento intermedio RE-Golgi y el aparato de Golgi, de modo que salen por gemación del RE transicional y transportan su mercancía hacia etapas posteriores de la vía secretora. Por el contrario, las **vesículas cubiertas de COPI** abandonan el compartimento intermedio RE-Golgi por gemación y llevan su carga en sentido retrógrado para devolver a las proteínas residentes a los compartimentos anteriores de dicha vía. Por consiguiente, COPI es una proteína de cubierta presente tanto en las vesículas de recuperación que devuelven a las proteínas residentes en el RE a compartimentos anteriores de este orgánulo del ERGIC o la red Golgi *cis* como en las vesículas que recuperan enzimas de procesamiento del Golgi de los compartimentos finales de este aparato. Por último, las **vesículas cubiertas de clatrina** se encargan del

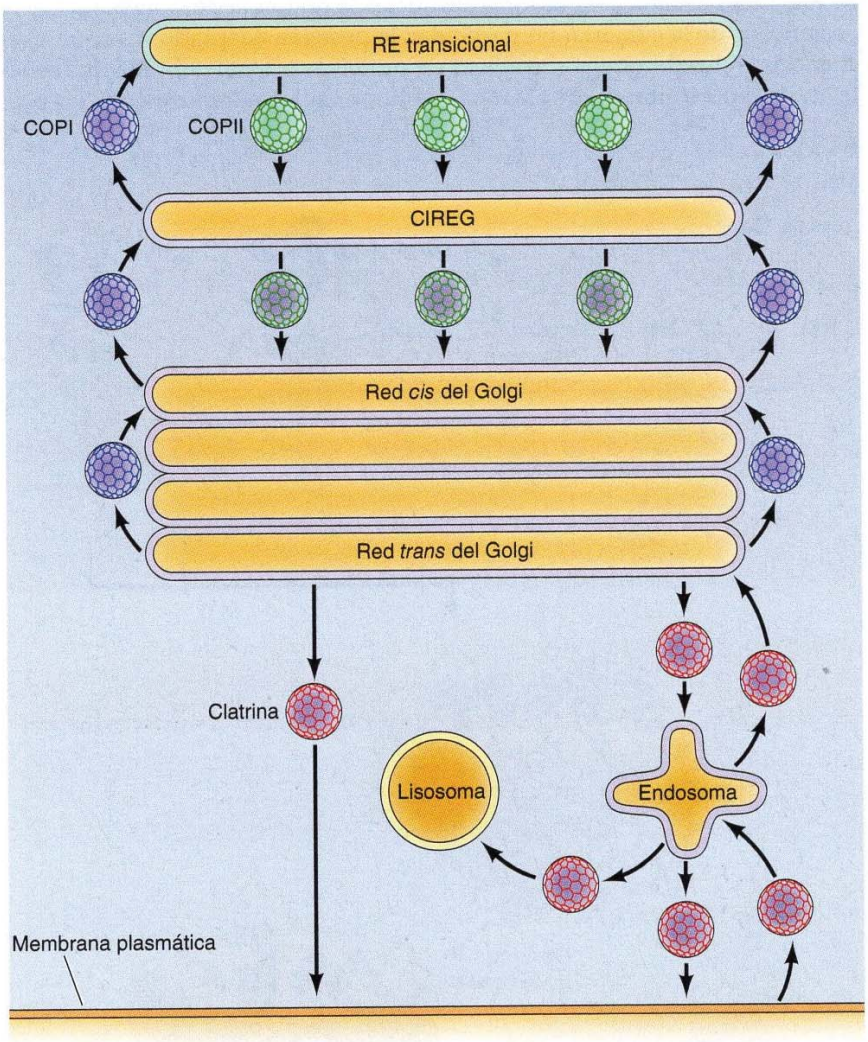


FIGURA 11.35 Transporte a través de vesículas cubiertas. Las vesículas cubiertas de COPII transportan su mercancía del RE al aparato de Golgi y las vesículas cubiertas de clatrina lo hacen en sentido retrógrado desde la red *trans* del Golgi. Las vesículas cubiertas de clatrina también llevan a cabo un transporte retrógrado desde la membrana plasmática hacia los endosomas y otros orgánulos, como la red *trans* del Golgi y los lisosomas. Las vesículas cubiertas de COPI recuperan proteínas residentes del CIREG y la red *cis* del Golgi y transportan a enzimas residentes en el aparato de Golgi desde la red *trans* hacia las cisternas.

transporte bidireccional entre la red *trans* del Golgi, los endosomas, los lisosomas y la membrana plasmática.

La formación de vesículas recubiertas está regulada por pequeñas proteínas que se unen a GTP (Arf y Sar), relacionadas con Ras y Ran. La Arf interviene en la formación de las vesículas recubiertas de COPI y clatrina que emergen del aparato de Golgi, y la función Sar lo hace en la formación de vesículas recubiertas de COPII, que emergen del RE. Estas proteínas unidas a GTP incorporan proteínas adaptadoras que median el ensamblaje de las vesículas interaccionando con las proteínas de carga y con las proteínas de la cubierta vesicular. Por ejemplo, la **Figura 11.36** ilustra la actividad de Arf en el ensamblaje de las vesículas recubiertas de clatrina en la red *trans*-Golgi. En primer lugar, la Arf/GDP se convierte en la forma activa ligada a GTP por la acción de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina localizado en la membrana de la red *trans*-Golgi. A continuación, la Arf/GTP recluta una proteína adaptadora que nuclea la selección de la mercancía y el ensamblaje de la cubierta. En particular, la proteína adaptadora se une a secuencias en los dominios citosólicos de proteínas transmembrana que señalizan su exportación desde el Golgi. Como se indicó anteriormente, las pro-

◆ El síndrome de Griscelli es una patología poco frecuente causada por mutaciones en el gen que codifica para Rab27a. Rab27a parece jugar un papel clave en el transporte de vesículas que contienen pigmentos (melanosomas) a la piel y el pelo, y en la exocitosis de las vesículas de los linfocitos T. Los pacientes con el síndrome de Griscelli exhiben un albinismo (falta de pigmentos) parcial y son inmunodeficientes.

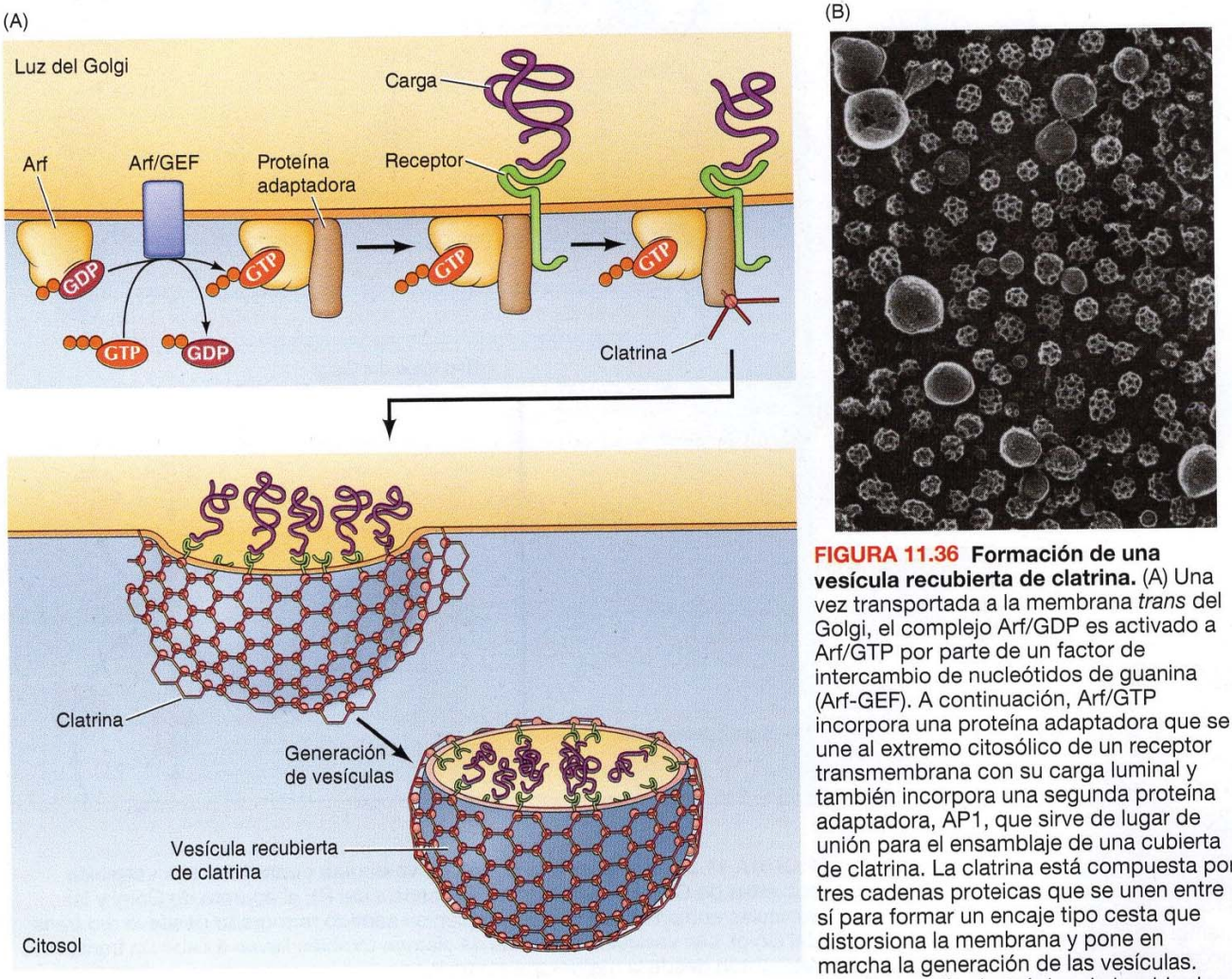


FIGURA 11.36 Formación de una vesícula recubierta de clatrina. (A) Una vez transportada a la membrana *trans* del Golgi, el complejo Arf/GDP es activado a Arf/GTP por parte de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Arf-GEF). A continuación, Arf/GTP incorpora una proteína adaptadora que se une al extremo citosólico de un receptor transmembrana con su carga luminal y también incorpora una segunda proteína adaptadora, AP1, que sirve de lugar de unión para el ensamblaje de una cubierta de clatrina. La clatrina está compuesta por tres cadenas proteicas que se unen entre sí para formar un encaje tipo cesta que distorsiona la membrana y pone en marcha la generación de las vesículas. (B) Micrografía electrónica de barrido de vesículas recubiertas con clatrina. (Cortesía de Tomas Kirchhausen, Universidad de Harvard).

teínas transmembrana incluyen receptores para proteínas de mercancía luminal, que son seleccionadas, por tanto, para su incorporación en vesículas. Además, la proteína adaptadora recluta clatrina e inicia el ensamblaje de la cubierta de la vesícula. La clatrina desempeña un papel estructural en la gemación de vesículas al ensamblarlas en una estructura reticular de tipo cesta que distorsiona la membrana e inicia la gemación.

Fusión de las vesículas

La fusión de una vesícula de transporte con su diana implica dos tipos de acontecimientos. En primer lugar, la vesícula de transporte debe reconocer específicamente la membrana diana correcta; por ejemplo, una vesícula que transporta enzimas lisosómicas tiene que llevar su carga sólo a los lisosomas. En segundo lugar, la membrana de la vesícula y la membrana diana deben fusionarse, entregándose el contenido de la vesícula al orgánulo diana. Las investigaciones realizadas en los últimos años han aclarado el proceso de fusión vesicular en el que el reconocimiento específico entre una vesícula y su diana está mediado por la interacción específica entre pares de proteínas transmembrana, seguido por interacciones adicionales entre proteínas que impulsan la fusión de las bicapas de fosfolípidos.

La interacción inicial entre las vesículas de transporte y las membranas diana específicas está mediada por **factores de anclaje** y pequeñas proteínas de unión a GTP (proteínas **Rab**). Se han identificado más de 60 proteínas Rab diferentes que funcionan, según se ha constatado, en procesos específicos de transporte de vesículas (**Tabla 11.1**). Las diferentes proteínas Rab o combinaciones de proteínas Rab marcan diferentes orgánulos y vesículas de transporte. Las proteínas Rab de vesículas en el estado ligado a GTP activo se unen a factores de anclaje de membranas, para proporcionar el puente inicial entre las membranas diana y de las vesículas (**Fig. 11.37**). Los factores de anclaje se unen también para estimular la formación de complejos entre proteínas transmembrana denominadas **SNARE** en la vesícula y membranas diana, lo que lleva a la fusión de las membranas.

Las proteínas implicadas en la fusión de las vesículas se identificaron por primera vez en el laboratorio de James Rothman, mediante el análisis bioquímico de sistemas de transporte vesicular reconstituidos procedentes de células de mamíferos. El análisis de las proteínas implicadas en la fusión de las vesículas en estos sistemas condujo a Rothman y a sus colaboradores a proponer que la fusión de vesículas estaría mediada por la interacción de pares específicos de SNARE, en la membrana vesicular y la membrana diana. In-

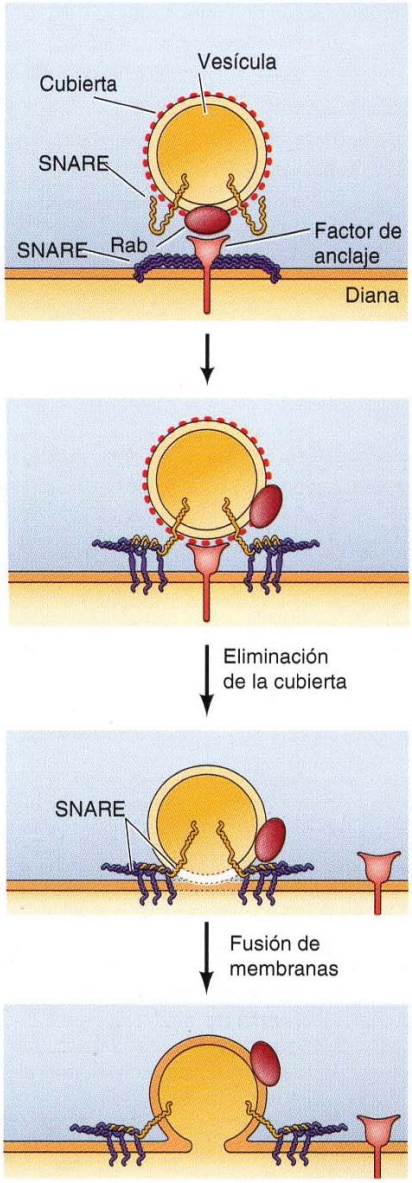


FIGURA 11.37 Anclaje y fusión de las vesículas. Una proteína Rab de la membrana de la vesícula se une a un factor de anclaje asociado con la membrana diana. A continuación tiene lugar la formación de complejos entre SNARE en la vesícula y las membranas diana. Los dominios arrollados de los SNARE se unen en cremallera entre sí, con lo que acercan la vesícula y las membranas, de manera que las membranas se fusionan.

TABLA 11.1 Proteínas Rab representativas

Proteína Rab	Etapa de transporte
Rab1A y B	RE a Golgi- intra-Golgi
Rab2A y B	RE a Golgi
Rab3A-D	Exocitosis
Rab4A y B	Endosoma a membrana plasmática
Rab5A-C	Fusión de endosomas temprano
Rab6A-C	Endosoma a Golgi, intra-Golgi, Golgi a RE
Rab7A y B	Endosoma tardío a lisosoma
Rab8A y B	Red *trans*-Golgi y endosoma de reciclaje a membrana plasmática
Rab10	Red *trans*-Golgi y endosoma de reciclaje a membrana plasmática basolateral
Rab14	Red *trans*-Golgi y endosoma de reciclaje a membrana plasmática apical
Rab22A	Endosoma de reciclaje a membrana plasmática

vestigaciones posteriores han confirmado que la formación de complejos entre SNARE de vesículas y diana es necesaria para la fusión de las membranas diana y de las vesículas, y han demostrado además que el apareamiento SNARE-SNARE aporta la energía para impulsar la fusión del fosfolípido. Todas las proteínas SNARE poseen un largo dominio central de hélice enrollada como la que se encuentra en las láminas nucleares (véase Fig. 10.4). Al igual que en las láminas, este dominio se une fuertemente a otros dominios de hélice enrollada y, en efecto, une a las SNARE, en membranas diana y de vesículas aproximando las dos membranas hasta un contacto directo y llevando a la fusión de las bicapas lipídicas.

Lisosomas

Los **lisosomas** son orgánulos rodeados de membrana que contienen una serie de enzimas capaces de degradar todas las clases de polímeros biológicos —proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos—. Los lisosomas funcionan como el sistema digestivo de la célula, sirviendo tanto para degradar el material captado del exterior de la célula como para digerir los componentes obsoletos de la propia célula. En su forma más sencilla, los lisosomas se observan como vacuolas esféricas densas, pero pueden exhibir diversidad de tamaños y de formas en función de los distintos materiales que hayan captado (**Fig. 11.38**). Por tanto, los lisosomas representan orgánulos morfológicamente diversos definidos por la función común de degradar material intracelular.

Hidrolasas lisosómicas ácidas

Los lisosomas contienen alrededor de 60 enzimas degradativas diferentes que pueden hidrolizar proteínas, ADN, ARN, polisacáridos y lípidos. Las

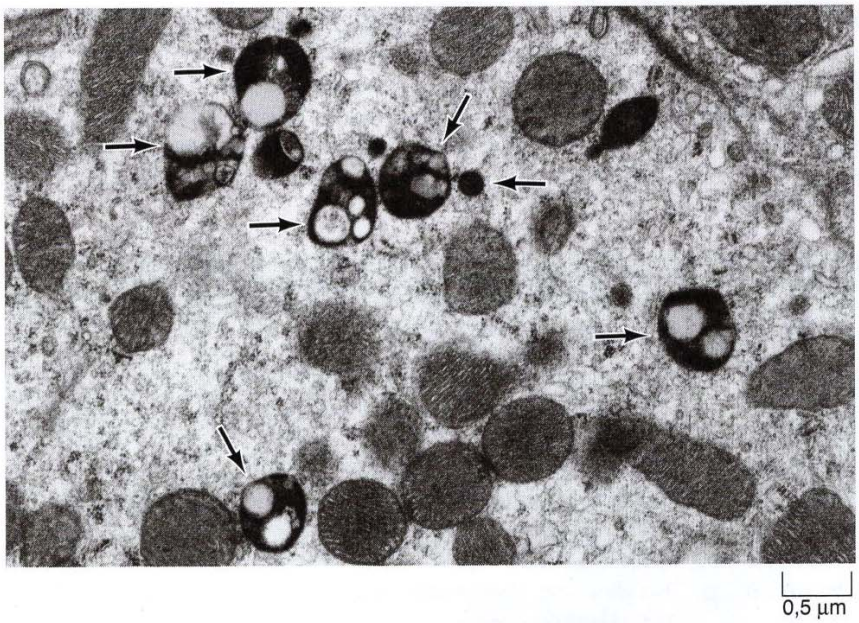
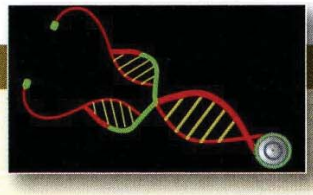


FIGURA 11.38 Microfotografía electrónica de lisosomas y de mitocondrias en una célula de mamífero. Los lisosomas están indicados con flechas. Obsérvese la variación en el tamaño y la forma, determinada por las diferencias en los materiales captados para ser digeridos.



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedad de Gaucher

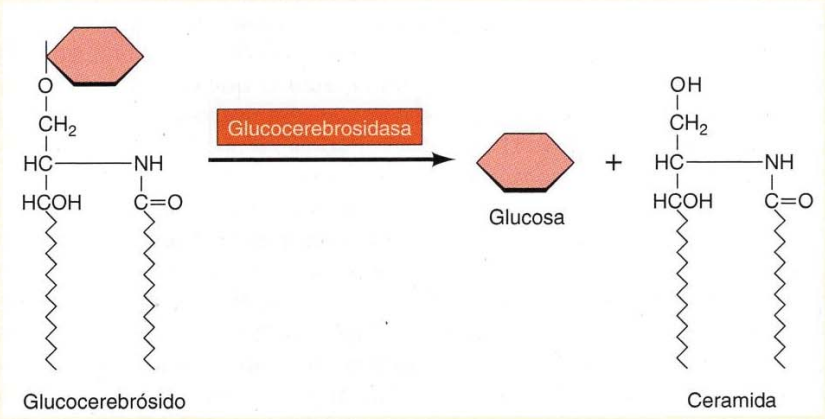
Enfermedad

La enfermedad de Gaucher es, de las enfermedades de depósito lisosómico, la más común, las cuales se deben a la incapacidad de los lisosomas para degradar sustancias que deberían degradar. La acumulación resultante de los compuestos no degradados da lugar a un aumento en el tamaño y número de los lisosomas en la célula, lo que acaba produciendo la disfunción celular y consecuencias patológicas en los órganos afectados. La enfermedad tiene tres variantes, que difieren en su severidad y en cómo afectan al sistema nervioso. La forma más común de la enfermedad (tipo I), no afecta al sistema nervioso; la enfermedad se manifiesta con esplenomegalia y hepatomegalia y por el desarrollo de lesiones óseas. Muchos pacientes con esta forma de la enfermedad no tienen síntomas importantes, y su esperanza de vida no se ve afectada. La enfermedad tipo I afecta principalmente a la población judía, con una frecuencia de aproximadamente 1 por cada 1.000 individuos. Las formas más severas de la enfermedad (tipos II y III) son mucho menos frecuentes y se presentan tanto en poblaciones judías como no judías. La forma más devastadora es la enfermedad tipo II, en la que la afectación neurológica es evidente en la infancia y los pacientes mueren a una edad temprana. La enfermedad tipo III, de severidad intermedia entre los tipos I y II, se caracteriza por la aparición de síntomas neurológicos (incluyendo demencia y espasticidad) alrededor de los diez años de edad.

Bases moleculares y celulares

La causa de la enfermedad de Gaucher es la deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa, que cataliza la hidrólisis de los glucocerebrósidos a glucosa y ceramida (véase la figura). Este déficit enzimático se demostró en 1965, y el gen responsable fue clonado en 1985. Desde entonces, se han identificado más de 100 mutaciones diferentes responsables de la enfermedad de Gaucher. Es interesante señalar que puede predecirse, en gran medida, la severidad de la enfermedad según la naturaleza de la mutación. Por ejemplo, los pacientes con una mutación que conduce a la sustitución, relativamente conservada, del aminoácido serina por asparragina tienen la enfermedad tipo I; los pacientes con una mutación que da lugar a la sustitución de prolina por leucina tienen deficiencias enzimáticas más severas y desarrollan la enfermedad tipos II o III.

Excepto en las formas muy raras de la enfermedad, tipos II y III, las únicas células afectadas en la enfermedad de Gaucher son los macrófagos. Debido a que su función es eliminar las células envejecidas y dañadas mediante fagocitosis, los macrófagos continuamente ingieren gran cantidad de lípidos, que normalmente son degradados en los lisosomas. Por tanto, las deficiencias de glucocerebrosidasa resultan particularmente evidentes en los macrófagos de estos órganos, lo que concuerda con que estos serían los principales órganos afectados en la mayor parte de los casos de enfermedad de Gaucher.



La deficiencia de la enzima en la enfermedad de Gaucher impide la hidrólisis de glucosilceramida a glucosa y ceramida.

Prevención y tratamiento

La enfermedad de Gaucher es uno de los ejemplos más importantes de una enfermedad que puede tratarse mediante tratamiento enzimático sustitutivo, en el que se utiliza la administración exógena de una enzima para corregir un defecto enzimático. Este abordaje del tratamiento de las enfermedades de depósito lisosómico lo sugirió Christian de Duve en los años 60, y se basa en la idea de que las enzimas administradas exógenamente podrían ser ingeridas por endocitosis y transportarse a los lisosomas. Este abordaje es especialmente interesante en la enfermedad de Gaucher tipo I, ya que el macrófago es la única célula diana. En los años 70, se descubrió que los macrófagos expresan receptores en la superficie celular que se unen a residuos de manosa de glicoproteínas extracelulares e internalizan posteriormente estas proteínas por endocitosis. Este hallazgo hizo pensar que la glucocerebrosidasa administrada exógenamente podría ser dirigida específicamente a los macrófagos mediante modificaciones que expusieran residuos de manosa. La primera terapia que se desarrolló utilizaba enzima preparada a partir de placenta humana; los estudios clínicos demostraron su eficacia y en 1991 fue aprobada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Posteriormente, se desarrolló para terapia una enzima producida por tecnología de ADN recombinante, que se utiliza en la actualidad en lugar de la enzima humana para proporcionar mayor disponibilidad y reducir la posibilidad de contaminación con agentes infecciosos, como los virus de la hepatitis.

Referencias

Deegan, P. B. and T. M. Cox. 2012. Imiglucerase in the treatment of Gaucher disease: a history and perspective. *Drug Des. Dev. Ther.* 6: 81–106.

mutaciones en los genes que codifican estas proteínas son responsables de más de 30 enfermedades congénitas humanas diferentes, que se denominan **enfermedades de depósito lisosómico**, ya que el material no degradado se acumula en los lisosomas de los individuos afectados. La mayoría de estas enfermedades se deben a deficiencias en una única enzima lisosómica. Por ejemplo, la enfermedad de Gaucher (la alteración más común) se debe a una mutación en el gen que codifica una enzima lisosómica requerida para la degradación de los glicolípidos. Una excepción curiosa es la enfermedad celular-I, que se debe a una eficiencia en la enzima que cataliza el primer paso en el marcaje de las enzimas lisosómicas con manosa-6-fosfato en el aparato de Golgi (véase Fig. 11.28). El resultado es una alteración generalizada en la incorporación de las enzimas lisosómicas a los lisosomas.

La mayoría de las enzimas lisosómicas son hidrolasas ácidas, que son activas al pH ácido (aproximadamente 5) del interior de los lisosomas pero no al pH neutro (aproximadamente 7,2) característico del resto del citoplasma (**Fig. 11.39**). El que estas hidrolasas lisosómicas necesiten un pH ácido proporciona una doble protección contra la digestión incontrolada de los contenidos del citosol; incluso si se rompiera la membrana lisosómica, las hidrolasas ácidas liberadas serían inactivas al pH neutro del citosol. Para mantener su pH ácido interno, los lisosomas deben concentrar activamente iones H^+ (protones). Esto se consigue mediante una bomba de protones en la membrana lisosómica, que transporta activamente protones al lisosoma desde el citosol. Este bombeo requiere un gasto de energía en forma de hidrólisis de ATP, ya que mantiene una concentración de H^+ aproximadamente cien veces más elevada en el interior del lisosoma que en el citoplasma.

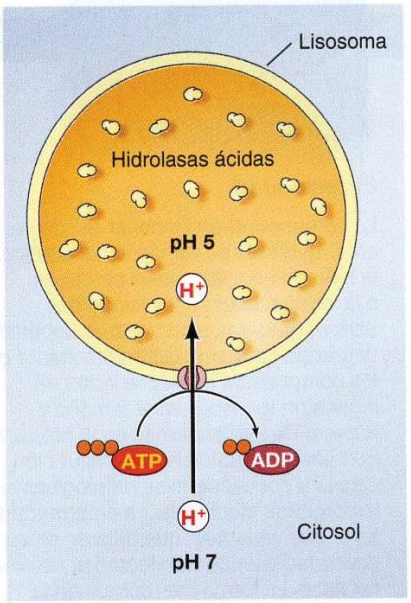


FIGURA 11.39 Organización del lisosoma. Los lisosomas contienen diversas hidrolasas ácidas que son activas al pH ácido interno del lisosoma, pero no al pH neutro del citosol. El pH interno ácido de los lisosomas es el resultado de la acción de una bomba de protones en la membrana del lisosoma, que importa protones desde el citosol acoplado a la hidrólisis de ATP.

Endocitosis y formación del lisosoma

Una de las funciones principales de los lisosomas es la digestión del material captado del exterior de la célula mediante **endocitosis**, que se discute en detalle en el Capítulo 14. Estel papel de los lisosomas se relaciona no sólo con su función, sino también con su formación. Concretamente, los lisosomas se forman mediante la fusión de las vesículas de transporte originadas desde la red *trans* del Golgi con un endosoma tardío, que contienen las moléculas ingeridas por endocitosis a partir de la membrana plasmática.

La formación de los **endosomas** y de los lisosomas representa así una intersección entre la vía secretora, mediante la que se procesan las proteínas lisosómicas, y la vía endocítica, mediante la cual son ingeridas las moléculas extracelulares a partir de la superficie de la célula (**Fig. 11.40**). Como se indicó anteriormente en este capítulo, las células de animales tienen tres tipos de endosomas: tempranos, de reciclaje y tardíos. Los endosomas tempranos reciben vesículas formadas por endocitosis en la membrana plasmática. El material del exterior de la célula es ingerido en vesículas endocíticas revestidas de clatrina, que se originan por gemación de la membrana plasmática y seguidamente se funden con los endosomas primarios. A continuación los componentes de la membrana son reciclados a la membrana plasmática (se tratará con detalle en el Cap. 14) y los endosomas primarios van madurando a endosomas tardíos, que son los precursores de los lisosomas. En cambio, las moléculas destinadas a degradación son transportadas por cuerpos multivesiculares y después a los endosomas tardíos.

Las hidrolasas de ácidos lisosómicos también son transportadas a endosomas tardíos desde la red *trans*-Golgi. Uno de los cambios importantes durante la maduración del endosoma es el descenso del pH interno hasta aproximadamente 5,5, lo que desempeña un papel clave en la liberación de las hidrolasas ácidas lisosómicas. Como se trató previamente, las proteínas lisosómicas son dirigidas a los lisosomas por residuos de manosa-6-fosfato, que son reconocidos por los receptores de manosa-6-fosfato en la red *trans* del

◆ El medicamento antimalárico cloroquina carece de carga y es capaz de atravesar membranas a pH fisiológicos. A pH acídicos, la cloroquina posee carga positiva y se acumula en el interior de las vacuolas digestivas del parásito (análogas a los lisosomas). La concentración elevada de cloroquina en el interior de las vacuolas digestivas se cree que es responsable de su actividad frente al parásito.

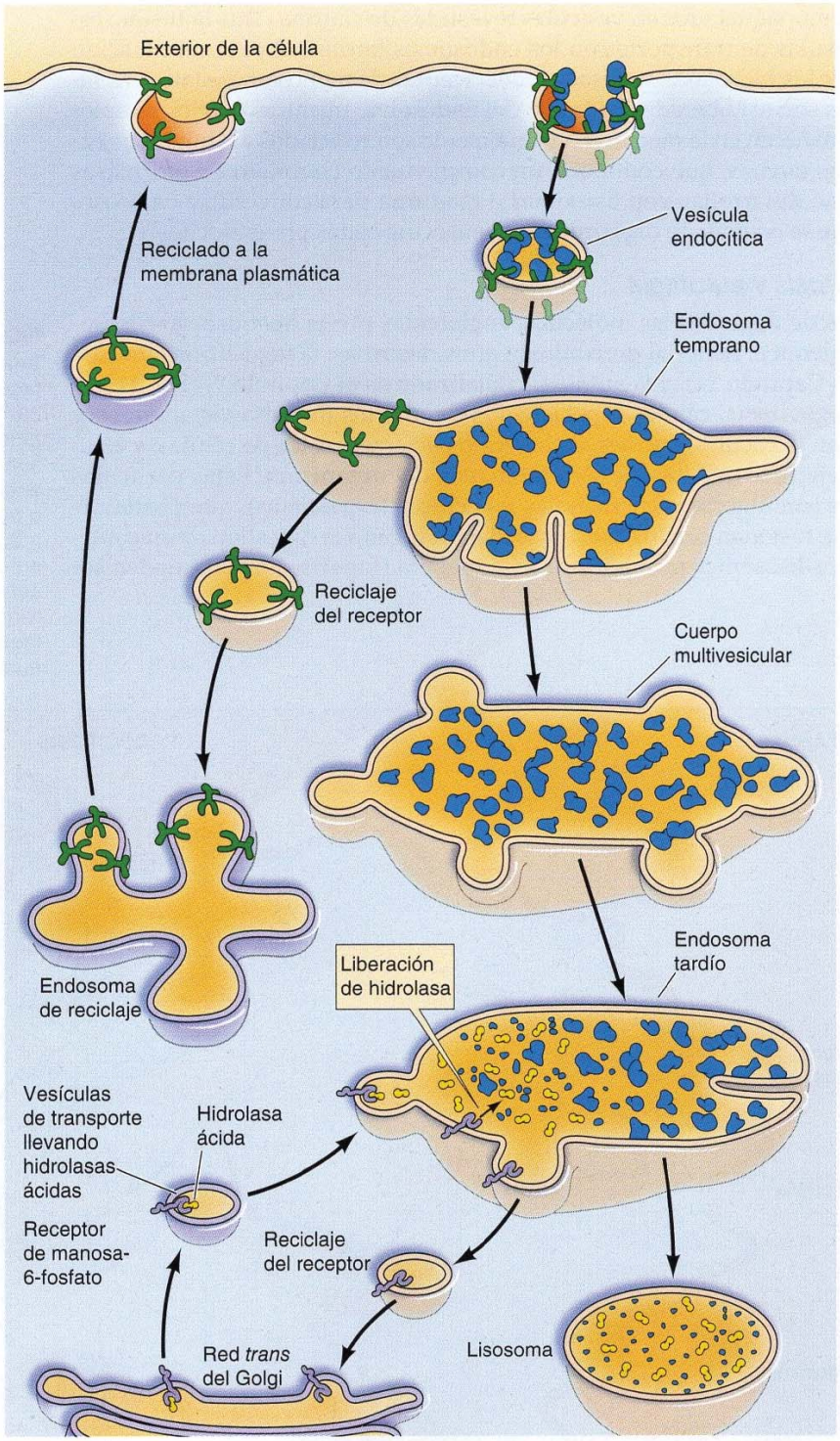


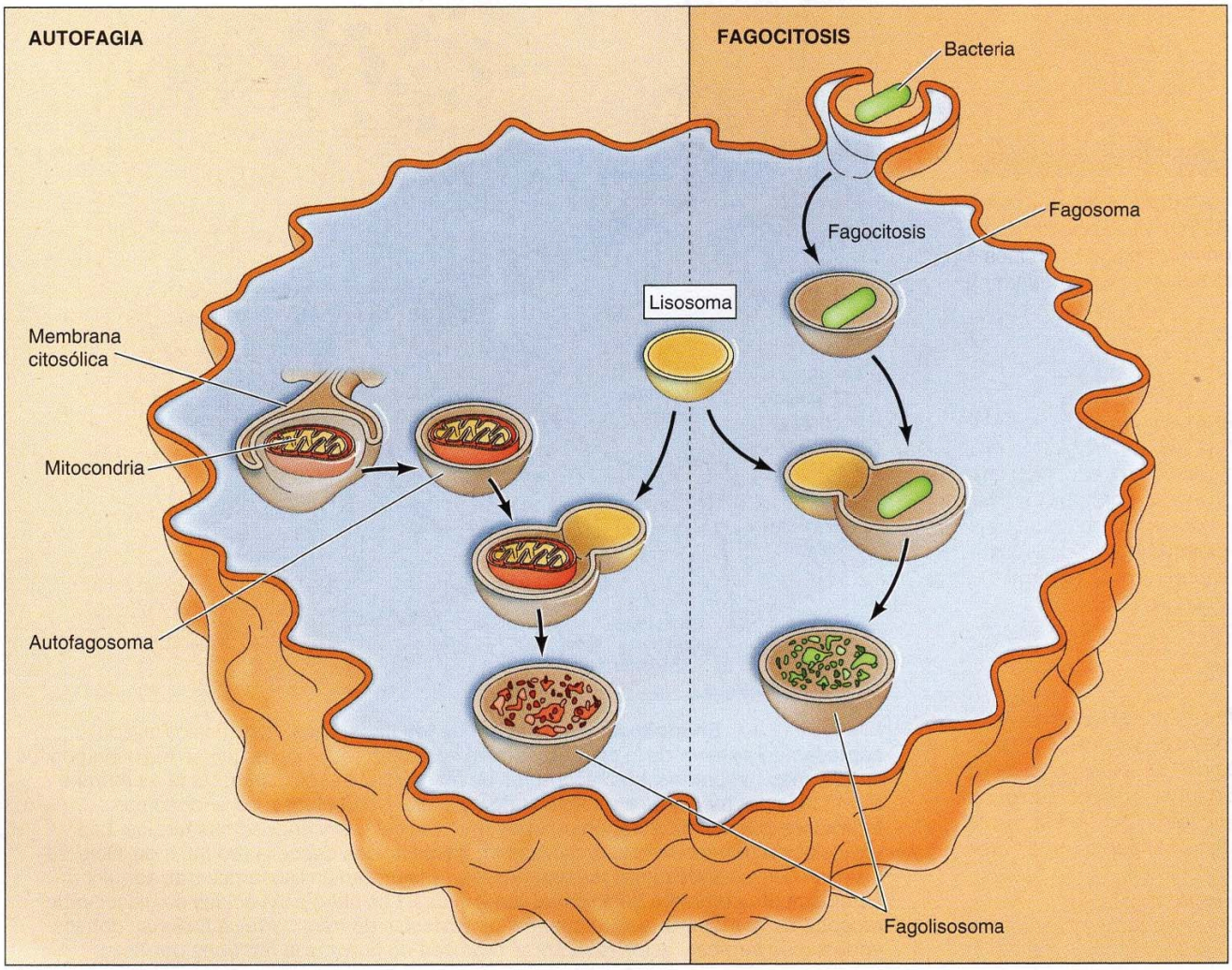
FIGURA 11.40 Endocitosis y formación de los lisosomas. Las moléculas son captadas del exterior de la célula mediante vesículas endocíticas que se fusionan con los endosomas tempranos. Los receptores de membrana se reciclan hacia la membrana plasmática por medio de endosomas de reciclaje. No obstante, los endosomas tempranos pueden madurar en cuerpos multivesiculares y endosomas tardíos. Las vesículas de transporte que llevan las hidrolasas ácidas desde la red *trans* del Golgi se fusionan con los endosomas tardíos, que se transforman en lisosomas tras adquirir un complemento completo de enzimas lisosómicas. Las hidrolasas ácidas se disocian del receptor de manosa-6-fosfato cuando las vesículas de transporte se fusionan con los endosomas tardíos y estos receptores regresan de nuevo a la red *trans* del Golgi.

Golgi y empaquetados en vesículas revestidas de clatrina. Tras la fusión, estas vesículas de transporte con los endosomas tardíos, el pH interno ácido hace que las hidrolasas se disocien del receptor de manosa-6-fosfato. Las hidrolasas son así liberadas en la luz del endosoma, mientras que los receptores permanecen en la membrana y finalmente son reciclados al Golgi. Los endosomas tardíos, que contienen un complemento completo de hidrolasas ácidas, se desarrollan con lisosomas o maduran para convertirse en lisosomas, que se ocupan de digerir las moléculas ingeridas por endocitosis.

Fagocitosis y autofagia

Además de degradar las moléculas englobadas por endocitosis, los lisosomas digieren el material derivado de otras dos rutas: la fagocitosis (analizada en el Capítulo 14), y la autofagia (analizada en el Capítulo 9) (**Fig. 11.41**). En la **fagocitosis**, células especializadas, como los macrófagos, ingieren y degradan partículas grandes, incluyendo bacterias, restos de células, y células envejecidas que han de ser eliminadas del organismo. Estas partículas grandes son ingeridas en vacuolas fagocíticas (**fagosomas**), que posteriormente se fusionan con los lisosomas, dando lugar a la digestión de su contenido. Los lisosomas formados de esta manera (**fagolisosomas**) pueden ser

FIGURA 11.41 Los lisosomas en la fagocitosis y en la autofagia. En la fagocitosis, partículas grandes (como bacterias) son ingeridas en vacuolas fagocíticas o fagosomas. En la autofagia, las membranas citosólicas engloban a porciones citoplasmáticas u orgánulos internos (como mitocondrias), formando autofagosomas. Los fagosomas y los autofagosomas se fusionan con lisosomas para dar lugar a fagolisosomas de gran tamaño en los que se digerirá su contenido.



bastante grandes y heterogéneos, ya que su tamaño y forma viene determinado por el contenido del material que esté siendo digerido.

Los lisosomas también son responsables de la **autofagia**, el recambio gradual de los propios componentes de la célula (véase Fig. 9.48). En contraste con la fagocitosis, la autofagia es una función de todas las células y da lugar a la degradación gradual de proteínas de larga duración. El primer paso de la autofagia parece consistir en la formación de una envoltura de membrana citosólica alrededor de una pequeña porción citoplasmática o un orgánulo interno (p. ej., una mitocondria). A continuación, la vesícula así formada (un **autofagosoma**) se fusiona con un lisosoma y se digieren sus contenidos (véase Fig. 11.41).

La autofagia no sólo conduce a la continua reposición de los constituyentes celulares, sino que también puede regularse durante el desarrollo y en respuesta al estrés. Por ejemplo, la autofagia desempeña un papel importante en muchos procesos de desarrollo, como la metamorfosis de los insectos, que implican una extensa remodelación tisular y la degradación de los componentes celulares. Además, la autofagia se activa cuando las células se ven privadas de nutrientes. En condiciones de agotamiento de los nutrientes, la autofagia permite a las células degradar las macromoléculas no esenciales de manera que sus componentes puedan ser reutilizados. Sin embargo, en otras circunstancias la autofagia tiene una función importante en la muerte celular programada, tal como se analiza en el Capítulo 18.

RESUMEN

Retículo endoplásmico

Retículo endoplásmico y secreción de proteínas: El retículo endoplásmico es el primer cruce de caminos en la distribución de las proteínas. En las células de los mamíferos, las proteínas destinadas a la secreción, a los lisosomas o a la membrana plasmática se traducen en los ribosomas unidos a membrana y son transferidas al RE rugoso mientras están siendo traducidas.

Ver Vídeo 11.1

Marcaje de las proteínas para dirigirse al retículo endoplásmico: Las proteínas pueden dirigirse al RE bien mientras están siendo traducidas o tras haber finalizado su traducción en el citosol. En las células de mamíferos, la mayoría de las proteínas son translocadas al RE mientras están siendo traducidas en ribosomas unidos a membrana. Los ribosomas que intervienen en la síntesis de las proteínas secretadas son dirigidos al retículo endoplásmico mediante secuencias señal en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica. Las cadenas polipeptídicas en crecimiento son translocadas posteriormente al RE a través de canales proteicos, y se liberan en la luz del RE al ser escindida la secuencia señal.

Ver Animación 11.1

Inserción de proteínas en la membrana del RE: Las proteínas integrales de membrana de la membrana plasmática o de las membranas del RE, del aparato de Golgi y de los lisosomas, se insertan inicialmente en la membrana del RE. En lugar de ser translocadas a la luz del RE, estas proteínas se anclan por hélices alfa que atraviesan la membrana y que detienen la transferencia de la cadena polipeptídica en crecimiento a través de la membrana.

Plegamiento y procesamiento de proteínas en el RE: Las cadenas polipeptídicas se pliegan en su conformación tridimensional correcta en el RE. En el RE también tiene lugar la *N*-glicosilación y la adición de los anclajes GPI.

PALABRAS CLAVE

retículo endoplásmico (RE), RE rugoso, RE de transición, RE liso, vesícula secretora, vía secretora

secuencia señal, microsoma, partícula de reconocimiento de la señal (SRP), ARN SRP, receptor SRP, translocón, peptidasa de la señal

proteína disulfuro isomerasa (EDI), anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI)

RESUMEN

Control de calidad en el RE: Muchas proteínas secretoras no se pliegan correctamente la primera vez. Las chaperonas detectan las proteínas plegadas incorrectamente y las reciclan a través de la vía de plegamiento. Aquellas proteínas que no pueden ser correctamente plegadas son desviadas de la vía secretora y marcadas para su degradación. La vía de respuesta a las proteínas no plegadas vigila la cantidad de proteínas sin plegar en el RE y regula las actividades celulares para mantener la capacidad de plegamiento de proteínas apropiada.

RE liso y síntesis de lípidos: El RE es el sitio principal de síntesis de lípidos en las células eucariotas, y el RE liso abunda en las células que tienen un metabolismo lipídico activo y que realizan la destoxificación de fármacos liposolubles.

Exportación de proteínas y lípidos desde el RE: Las proteínas y los lípidos son transportados en vesículas desde el RE al aparato de Golgi. Las secuencias señalizadoras intervienen en el empaquetamiento selectivo de las proteínas en vesículas que las transportarán al ERGIC y al aparato de Golgi. Las proteínas residentes en el RE se marcan con otras secuencias señalizadoras que determinan su regreso al RE desde el Golgi a través de una vía de reciclaje.

Aparato de Golgi

Organización del Golgi: El aparato de Golgi participa en el procesamiento y en la distribución de las proteínas, así como en la síntesis de lípidos y polisacáridos. Las proteínas son transportadas desde el retículo endoplásmico a la red *cis* del compartimento del Golgi. Tienen lugar distintas formas de procesamiento a medida que las proteínas se desplazan a través de los compartimentos medio y *trans* a la red *trans*-Golgi. Las cisternas del apilamiento y sus proteínas modificadas maduran para dar lugar a la red *trans* del Golgi, en el que se distribuyen y empaquetan las proteínas en vesículas que las transportarán hacia los endosomas, la membrana plasmática o el exterior celular.

Ver Animación 11.2

Glicosilación de proteínas en el Golgi: Los *N*-oligosacáridos añadidos a las proteínas en el RE son modificados en el Golgi. Aquellas proteínas destinadas a los lisosomas son fosforiladas específicamente en los residuos de manosa, y la manosa-6-fosfato actúa como una señal que dirige su transporte a los lisosomas desde la red *trans* del Golgi. En el Golgi también tiene lugar la *O*-glicosilación.

Metabolismo de lípidos y de polisacáridos en el Golgi: El aparato de Golgi es el lugar donde se sintetizan los glicolípidos, la esfingomielina y los polisacáridos complejos de la pared celular vegetal.

Distribución y exportación de proteínas desde el aparato de Golgi: Las proteínas se distribuyen en la red *trans* del Golgi para ser empaquetadas en vesículas de transporte que se dirigen a ser secretadas, a la membrana plasmática, a los lisosomas o a las vacuolas de las levaduras y plantas. En las células polarizadas, las proteínas se dirigen específicamente a los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática.

Ver Vídeos 11.2 y 11.3

Mecanismo de transporte de las vesículas

Aproximaciones experimentales al conocimiento del transporte de las vesículas: El mecanismo de transporte de las vesículas se ha determinado mediante el estudio de mutantes de levaduras, de sistemas reconstituidos de células libres y de vesículas sinápticas y visualización del tráfico de proteínas en células vivas usando proteínas marcadas con GFP.

PALABRAS CLAVE

degradación asociada al RE (ERAD), calnexina, calreticulina, respuesta a las proteínas no plegadas (UPR)

flipasa

aparato de Golgi, complejo de Golgi, red *trans* del Golgi

manosa-6-fosfato, región señal

dominio apical, dominio basolateral, vacuola

vesícula sináptica

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Selección de la mercancía, proteínas de revestimiento y gemación de vesículas: La superficie citoplásmica de la mayoría de las vesículas está recubierta de proteínas que dirigen la gemación de las vesículas. Las moléculas específicas que se transportarán se seleccionan por medio de complejos de pequeñas proteínas de unión a GTP y proteínas adaptadoras que se asocian a las proteínas de cubierta.

Ver Vídeo 11.4

clatrina, COPI, vesícula cubierta de COPII, COPII, vesícula recubierta de COP, vesícula recubierta de clatrina

Fusión de las vesículas: La interacción inicial entre vesículas y sus membranas diana está mediada por la unión de factores de anclaje a las proteínas Rab. Las interacciones posteriores entre las proteínas transmembrana en las membranas diana y de la vesícula llevan a la fusión de las membranas.

factor de anclaje, Rab, SNARE

Lisosomas

Hidrolasas ácidas lisosómicas: Los lisosomas contienen una serie de hidrolasas ácidas que degradan proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos. Estas enzimas funcionan específicamente al pH ácido del interior de los lisosomas.

lisosoma, enfermedad de depósito lisosómico

Endocitosis y formación de los lisosomas: Las moléculas extracelulares captadas por endocitosis son transportadas a los endosomas tempranos. Las moléculas destinadas para su degradación y posterior transporte a endosomas tardíos, que maduran en lisosomas como hidrolasas de ácidos lisosómicos, son suministradas desde el Golgi.

endocitosis, endosoma

Fagocitosis y autofagia: Los lisosomas son responsables de la degradación de partículas grandes, ingeridas mediante la fagocitosis, y de la digestión gradual de los propios componentes de la célula mediante la autofagia.

fagocitosis, fagosoma, fagolisosoma, autofagia, autofagosoma

Preguntas

1. ¿Cuál era la evidencia experimental original que indicaba la vía secretora RE rugoso → aparato de Golgi → vesículas secretoras → proteína secretada?
2. ¿Cómo proporcionó la traducción *in vitro* de ARNm pruebas de la existencia de una secuencia señal que dirige a proteínas secretoras potenciales al retículo endoplásmico rugoso?
3. Compara y contrasta la translocación cotraduccional y postraduccional de las cadenas polipeptídicas en el retículo endoplásmico.
4. Sec61 es un componente crítico del canal proteico localizado en la membrana del RE. En las células mutantes para Sec61, ¿cuál es el destino de las proteínas que normalmente se localizan en el aparato de Golgi?
5. ¿Por qué los grupos de carbohidratos de las glicoproteínas están siempre expuestos en la superficie de la célula?
6. ¿Cuál sería el efecto de mutar la secuencia KDEL de una proteína residente en el RE como BiP? ¿Sería este efecto similar o distinto del que se obtendría al mutar la proteína receptora de KDEL?
7. ¿Cómo se dirige una proteína lisosómica a un lisosoma? ¿Qué efecto tendría la adición de una región señalizadora diana para un lisosoma, sobre la localización subcelular de una proteína que normalmente es citosólica? ¿Cómo afectaría a la localización de una proteína que normalmente es secretada?

8. ¿Cuál es el destino predecible de las hidrolasas ácidas lisosómicas en la enfermedad celular-I, en la que las células carecen de la enzima requerida para la formación de residuos de manosa-6-fosfato?
9. ¿Qué procesos resultan en la presencia de glicolípidos y esfingolípidos en la cara externa pero no en la interna de la bicapa de la membrana plasmática?
10. Un paciente llega a tu clínica con una acumulacíon de glucocerebrósidos en sus lisosomas. ¿Cuál es tu diagnóstico, y qué terapia sugerirías?
11. Los lisosomas contienen poderosas enzimas hidrolíticas, que son transportadas desde su sitio de síntesis en el RE vía el aparato de Golgi. ¿Por qué estas enzimas no dañan a los constituyentes de estos orgánulos?
12. ¿Cuál es la fuente de energía para la fusión entre las membranas diana y vesicular?

Bibliografía

Retículo endoplásmico

Aebi, M., R. Bernasconi, S. Clerc and M. Molinari. 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* 35: 74–82. [R]

Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67: 835–851. [P]

Braakman, I. and N. J. Bulleid. 2011. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 80: 71–99. [R]

Chen, S., P. Novick and S. Ferro-Novick. 2013. ER structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25: 428–433. [R]

Dancourt, J. and C. Barlowe. 2010. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Ann. Rev. Biochem.* 79: 777–802. [R]

Ferris, S. P., V. K. Kodali and R. J. Kaufman. 2014. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis. Model Mech.* 7: 331–341. [R]

Goyal, U. and C. Blackstone. 2013. Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2492–2498. [R

Hegde, R. S. and R. J. Keenan. 2011. Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 787–798. [R]

Hetz, C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 89–102. [R]

Park, E. and T. A. Rapoport. 2012. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Ann. Rev. Biophys.* 41: 21–40. [R]

Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal and J. Lippincott-Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389: 81–85. [P]

Ron, D. and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 519–529. [R]

Sebastian, T. T., R. D. Baldridge, P. Xu and T. R. Graham. 2012. Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 1068–1077. [R]

Shao, S. and R. S. Hegde. 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 25–56. [R]

Smith, M. H., H. L. Ploegh and J. S. Weissman. 2011. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 334: 1086–1090. [R]

van den Berg, B., W. M. Clemens Jr., I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison and T. A. Rapaport. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36–44. [P]

Walter, P. and D. Ron. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081–1085. [R]

Aparato de Golgi

Armstrong, J. 2010. Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends Cell Biol.* 20: 580–585. [R]

Banfield, D. K. 2011. Mechanisms of protein retention in the Golgi. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a005264. [R]

Baranski, T. J., P. L. Faust and S. Kornfeld. 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63: 281–291. [P]

De Matteis, M.A. and A. Luini. 2008. Exiting the Golgi complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 273–284. [R]

Glick, B. S. and A. Luini. 2011. Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a005215. [R]

Guo, Y., D. W. Sirkis and R. Schekman. 2014. Protein sorting at the *trans*-Golgi network. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 169–206. [R]

Kienzle, C. and J. von Blume. 2014. Secretory cargo sorting at the *trans*-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 24: 584–593. [R]

Lowe, M. 2011. Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 85–93. [R]

Matsuura-Tokita, K., M. Takeuchi, A. Ichihara, K. Mikuriya and A. Nakano. 2006. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441: 1007–1010. [P]

Morriswood, B. and G. Warren. 2013. Stalemate in the Golgi battle. *Science* 341: 1465–1466. [R]

Pfeffer, S. R. 2009. Multiple routes of protein transport from endosomes the *trans* Golgi network. *FEBS Letters* 583: 3811–3816. [R]

Stanley, P. 2011. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a005199. [R]

Xiang, L., E. Etxeberria and W. Van den Ende. 2013. Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. *FEBS J.* 280: 979–993. [R]

Mecanismo de transporte de las vesículas

Bröcker, C., S. Engelbrecht-Vandré and C. Ungermann. 2010. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current Biol.* 20: R943–R952. [R]

Cai, H., K. Reinisch and S. Ferro-Novick. 2007. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell* 12: 671–682. [R]

Carmosino, M., G. Valenti, M. Caplan and M. Svelto. 2010. Polarized traffic towards the cell surface: how to find the route. *Biol. Cell* 102: 75–91. [R]

Faini, M., R. Beck, F. T. Wieland and J. A. G. Briggs. 2013. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol.* 23: 279–288. [R]

Fries, E., and J. E. Rothman. 1980. Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3870–3874. [P]

Gillingham, A. K. and S. Munro. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 579–611. [R]

Hong, W. J. and S. Lev. 2014. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol.* 24: 35–43. [R]

Hutagalung, A. H. and P. J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 91: 119–149. [R]

Mellman, I. and S. D. Emr. 2013. A Nobel Prize for membrane traffic: vesicles find their journey's end. *J. Cell Biol.* 203: 559–561. [R]

Novick, P., C. Field and R. Schekman. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21: 205–215. [P]

Pucadyil, T. J. and S. L. Schmid. 2009. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* 325: 1217–1220. [R]

Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318–324. [P]

Zanetti, G., K. B. Pahuja, S. Studer, S. Shim and R. Schekman. 2012. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nature Cell Biol.* 14: 20–28. [R]

Lisosomas

Bissig, C. and J. Gruenberg. 2013. Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5:a016816 [R]

Coutinho, M. F., M. J. Prata and S. Alves. 2012. Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol. Genet. Metab.* 105: 542–550. [R]

Forgac, M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 917–929. [R]

Luzio, J. P., P. R. Pryor and N. A. Bright. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 622–632. [R]

Neufeld, E. F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 257–280. [R]

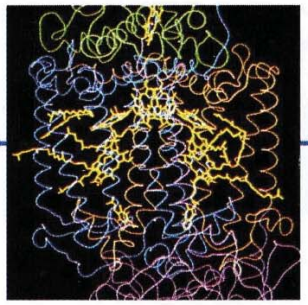
Rubinsztein, D. C., T. Shpilka and Z. Elazar. 2012. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current Biol.* 22: R29–R34. [R]

Saftig, P. and J. Klumperman. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 623–635. [R]

Settembre, C., A. Fraldi, D. L. Medina and A. Ballabio. 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 283–296. [R]

Shen, H.-M. and N. Mizushima. 2014. At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 39: 61–71. [R]

Weidberg, H., E. Shvets and Z. Elazar. 2011. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 80: 125–156. [R]



Capítulo 12

Mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas

Mitocondrias 447

Cloroplastos y otros plástidos 458

Peroxisomas 466

MEDICINA MOLECULAR: Enfermedades de las mitocondrias: neuropatía óptica hereditaria de Leber 452

MEDICINA MOLECULAR: Trastornos de la biogénesis de los peroxisomas 472

Los orgánulos citoplásmicos, además de estar implicados en el transporte y distribución de las proteínas, proporcionan compartimentos especializados en los que tienen lugar diversas actividades metabólicas. Una actividad fundamental de todas las células es generar energía metabólica, y son dos los orgánulos que están dedicados específicamente al metabolismo energético y a la producción de ATP. Las mitocondrias son responsables de generar la mayoría de la energía útil derivada de la degradación de los lípidos y de los carbohidratos, y los cloroplastos utilizan la energía obtenida de la luz solar para generar tanto ATP como poder reductor para sintetizar carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O. El tercer orgánulo que se trata en este capítulo, el peroxisoma, contiene enzimas que intervienen en diversas rutas metabólicas, incluyendo la degradación de los ácidos grasos y fotorrespiración.

Las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas difieren de los orgánulos tratados en el capítulo anterior no sólo en sus funciones, sino también en su mecanismo de formación. Las proteínas destinadas a las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas, en lugar de sintetizarse en los ribosomas unidos a membrana y ser trasladadas al retículo endoplásmico, se sintetizan en los ribosomas libres del citosol y son importadas a sus orgánulos de destino en forma de cadenas polipeptídicas completas. Las mitocondrias y los cloroplastos también contienen sus propios genomas, que incluyen algunos genes que se transcriben y traducen en el propio orgánulo. Por tanto, la distribución de las proteínas a los orgánulos citoplásmicos tratados en este capítulo es diferente de las rutas de transporte vesicular que conectan el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática.

Mitocondrias

Las **mitocondrias** desempeñan un papel crucial en la generación de energía metabólica en las células eucariotas. Como ya se comentó en el Capítulo 3, son responsables de la mayor parte de la energía útil derivada de la degradación de los carbohidratos y de los ácidos grasos, que es convertida en ATP por el proceso de la fosforilación oxidativa. La mayoría de las proteínas mitocondriales son traducidas en los ribosomas citoplásmicos libres, y son importadas al orgánulo debido a señales directoras específicas. Además, las mitocondrias son únicas entre los orgánulos citoplásmicos ya tratados en que contienen su propio ADN, que codifica ARNt, ARNr, y algunas proteínas mitocondriales. El ensamblaje de las mitocondrias implica, por tanto, a proteínas codificadas por su genoma propio y traducidas en el orgánulo, así como a proteínas codificadas por el genoma nuclear e importadas desde el citosol.

Organización y función de las mitocondrias

Las **mitocondrias** están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana mitocondrial interna y otra externa separadas por un espacio intermembrana (**Fig. 12.1**). La membrana interna forma numerosos pliegues (**crestas**), que se extienden hacia el interior (**o matriz**) del orgánulo. Cada uno de estos componentes desempeña un papel funcional distinto, siendo la matriz y la membrana interna los principales compartimentos funcionales de las mitocondrias.

La matriz contiene el sistema genético mitocondrial así como las enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo (**Fig. 12.2**). Como ya se trató en el Capítulo 3, la fuente principal de energía metabólica en las células animales es la degradación oxidativa de la glucosa y de los ácidos grasos. Las etapas iniciales del metabolismo de la glucosa (glicólisis) tienen lugar en el citoplasma, donde la glucosa es convertida a piruvato (véase Fig. 3.2). El piruvato es posteriormente transportado al interior de la mitocondria, donde su oxidación completa a CO_2 produce la mayor parte de la energía utilizable (ATP) procedente del metabolismo de la glucosa. Esto implica la oxidación inicial del piruvato a acetil CoA, que posteriormente es degradado hasta CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico (véanse Figs. 3.3 y 3.4). La oxidación de los ácidos grasos también produce acetil CoA (véase Fig. 3.5), que de forma similar es metabolizado por el ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias. Por tanto, las enzimas del ciclo del ácido cítrico (localizadas en la matriz mitocondrial) tienen un papel central en la degradación oxidativa tanto de los carbohidratos como de los ácidos grasos.

La oxidación del acetil CoA a CO_2 está acoplada a la reducción de NAD^+ y FAD a NADH y $FADH_2$ respectivamente. Por tanto, la mayor parte de la energía derivada del metabolismo oxidativo es producida por el proceso de fosforilación oxidativa (que se tratará en detalle en el Cap. 3), que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna. Los electrones de alta energía del NADH y $FADH_2$ se transfieren al oxígeno molecular a través de una serie de transportadores de la membrana (véanse Figs. 3.6 y 3.7). La energía derivada de estas reacciones de transferencia de electrones se convierte en energía potencial acumulada en forma de un gradiente de protones a través de la membrana, que es utilizada para dirigir la síntesis de ATP. La membrana interna

VÍDEO 12.1

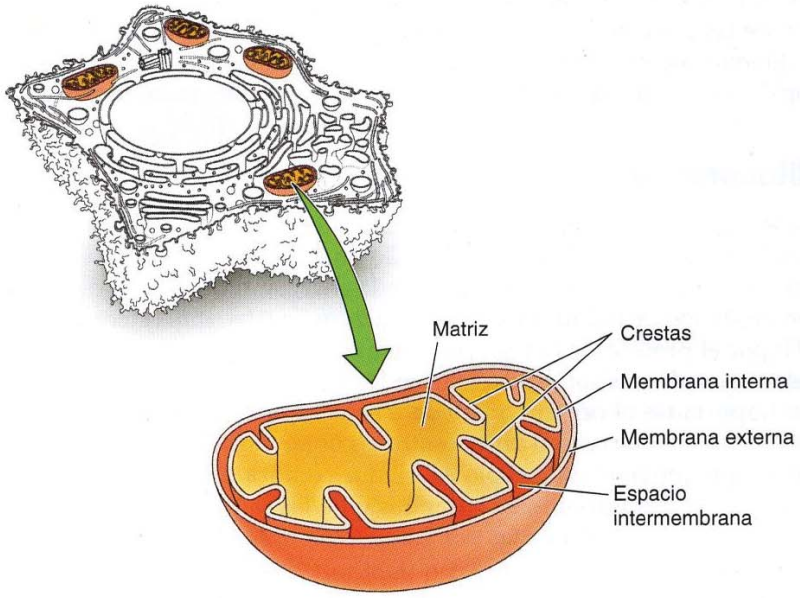
sites.sinauer.com/cooper7e/v12.1

Redes mitocondriales. En la mayoría de las células, las mitocondrias existen como parte de una gran red interconectada.

VÍDEO 12.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v12.2

Dinámica mitocondrial. Los episodios continuos de fusión y fisión remodelan la red mitocondrial y modifican la morfología y la función.



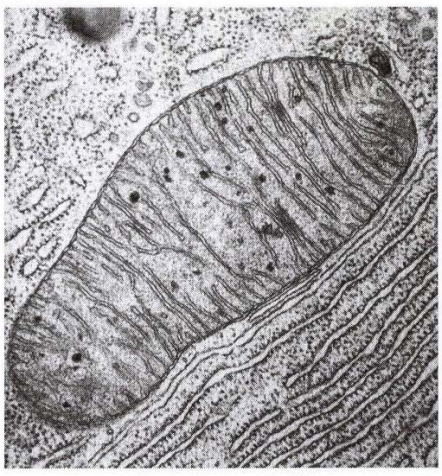


FIGURA 12.1 Estructura de una mitocondria. Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana interna y una externa. Los pliegues de la membrana interna (crestas) se extienden hacia el interior de la matriz.

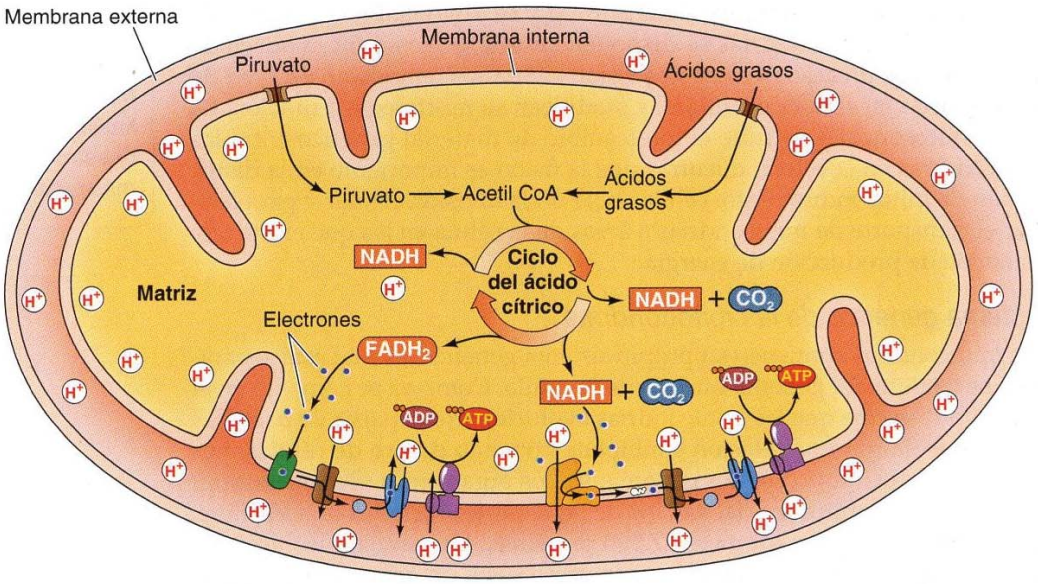


FIGURA 12.2 Metabolismo oxidativo en las mitocondrias. El piruvato y los ácidos grasos son importados del citosol y se convierten en acetil CoA en la matriz mitocondrial. A continuación, el acetil CoA se oxida a CO_2 por medio del ciclo del ácido cítrico unido a la reducción de NAD^+ y FAD a NADH y $FADH_2$, respectivamente. Los electrones de NADH y $FADH_2$ de alta energía son transferidos a través de una serie de transportadores en la membrana interna al oxígeno molecular, unido a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana. La energía almacenada en el gradiente de protones se utiliza a menudo para impulsar la síntesis de ATP.

◆ La integridad en la membrana externa mitocondrial desempeña un papel fundamental en la regulación de la muerte celular programada (véase Capítulo 18).

mitocondrial representa de esta manera el lugar principal de generación de ATP, y este papel fundamental se refleja en su estructura. Primero, el incremento de su superficie mediante su plegamiento en crestas. Además, la membrana interna mitocondrial contiene una proporción inhabitualmente elevada (más del 70%) de proteínas, que intervienen en la fosforilación oxidativa así como en el transporte de metabolitos (p. ej., piruvato y ácidos grasos) entre el citosol y la mitocondria. Por otra parte, la membrana interna es impermeable a la mayoría de los iones y de las moléculas pequeñas —una propiedad crítica para mantener el gradiente de protones que dirige la fosforilación oxidativa.

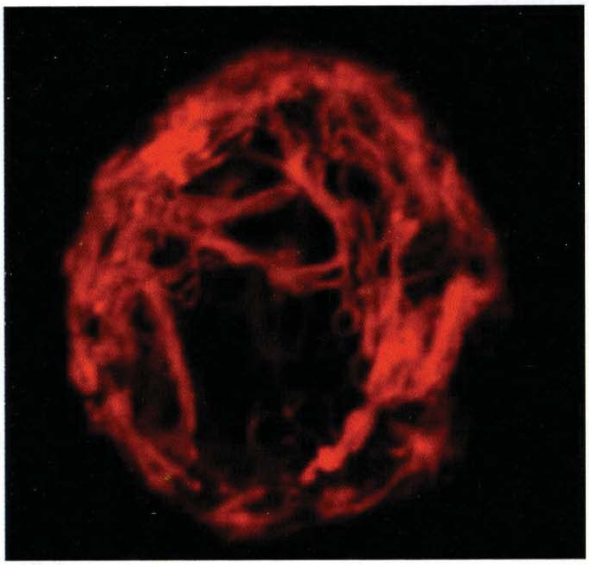


FIGURA 12.3 Red mitocondrial. Micrografía de fluorescencia de una célula que expresa una proteína mitocondrial marcada con proteína fluorescente verde (PFG). Las mitocondrias forman una red interconectada. (Por cortesía de Jennifer Lippincott-Schwartz y Kasturi Mitra.)

A diferencia de la membrana interna, la membrana externa mitocondrial es completamente permeable a las moléculas pequeñas. Esto es debido a que contiene unas proteínas denominadas **porinas**, que forman canales que permiten la difusión libre de moléculas menores de 1.000 daltons. Por tanto, la composición del espacio intermembrana es similar a la del citosol respecto a los iones y a las moléculas pequeñas. Consecuentemente, la membrana mitocondrial interna es la barrera funcional para el paso de moléculas pequeñas entre el citosol y la matriz y mantiene el gradiente de protones que dirige la fosforilación oxidativa.

La viabilidad de la célula depende del funcionamiento eficaz de las mitocondrias, ya que constituyen las principales fuentes de energía celular. En muchos tipos celulares, las mitocondrias han de localizarse en la proximidad de áreas de gran consumo de energía, como las sinapsis neuronales. Por otra parte, las mitocondrias no son orgánulos estáticos,

sino que se fusionan continuamente entre sí y se dividen. En la mayoría de las células, las mitocondrias se disponen en una gran red interconectada (**Fig. 12.3**). Los procesos de fusión y fisión continuos remodelan esta red de mitocondrias en el interior celular, y modifican su morfología y función. La fusión mitocondrial permite el intercambio de material genético entre las mitocondrias en la célula, mientras que la fisión es importante en la distribución de mitocondrias entre células hijas en la división celular y para facilitar el transporte de mitocondrias a áreas de la célula en las que existe alta demanda de producción de energía.

◆ Puesto que casi todas las mitocondrias son heredadas de la madre, es posible determinar el linaje materno humano hasta nuestro ancestro femenino común más reciente: Eva mitocondrial.

Sistema genético de las mitocondrias

Las mitocondrias contienen su propio sistema genético, el cual está separado y es distinto del genoma nuclear de la célula. Como ya se comentó en el Capítulo 1, se cree que las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias que desarrollaron una relación simbiótica viviendo dentro de células más grandes (**endosimbiosis**). Los genomas de los organismos vivos más similares al genoma mitocondrial son los de las α-proteobacterias de vida libre, que codifican aproximadamente 7.000 proteínas. Un parásito intracelular como la α-proteobacteria *Rickettsia prowazekii* tiene un genoma menor, con unos 830 genes codificantes de proteínas. Al igual que las mitocondrias, *Rickettsia prowazekii* es capaz de reproducirse sólo en el interior de células eucariotas, pero a diferencia de las mitocondrias todavía transcribe y traduce la mayoría de sus propios genes.

El genoma mitocondrial está constituido por moléculas circulares de ADN, como los de las bacterias, presentes en varias copias por orgánulo. Varían considerablemente en tamaño entre las diferentes especies. La mayoría de los genomas mitocondriales actuales codifican un número pequeño de proteínas que son componentes esenciales para el sistema de fosforilación oxidativa. Además, el genoma mitocondrial codifica todos los ARN ribosómicos y la mayoría de los ARN de transferencia necesarios para la traducción en la mitocondria de estas secuencias codificantes. Otras proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares; se piensa que éstas han sido transferidas al núcleo desde el genoma mitocondrial ancestral.

Los genomas de las mitocondrias humanas y de la mayoría de los demás animales tienen sólo unas 16 kb, mientras que en las levaduras (unas 80 kb) y en las plantas (más de 200 kb) se encuentran genomas mitocondriales sustancialmente más elevados. Sin embargo, estos genomas mitocondriales están compuestos predominantemente por secuencias no codificantes y no parecen contener significativamente más información genética. Por ejemplo, el genoma mitocondrial de la planta *Arabidopsis thaliana* tiene en torno a 370 kb, pero codifica sólo 31 proteínas: poco más del doble del número codificado por el ADN mitocondrial humano.

El genoma mitocondrial humano codifica 13 proteínas implicadas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (**Fig. 12.4**). Los genes mitocondriales que codifican estas proteínas se transcriben y traducen dentro de las propias mitocondrias, que contienen sus propios ribosomas y ARNt. El ADN mitocondrial humano codifica ARNr 16S y 12S y 22 ARNt, necesarios para la traducción de las proteínas codificadas por el genoma de

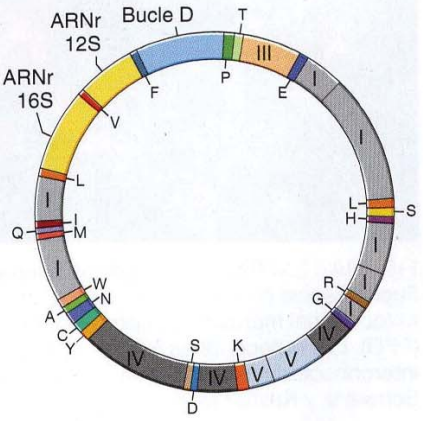


FIGURA 12.4 Genoma mitocondrial humano. El genoma contiene 13 secuencias codificadoras de proteínas, que son designadas como componentes de los complejos respiratorios I, III, IV o V. Además, el genoma contiene genes para los ARNr 16S y 12S y para 22 ARNt, que son designados por el código de una letra para el aminoácido correspondiente. La región del genoma designada «bucle D» contiene un origen de replicación del ADN y secuencias promotoras de la transcripción.

TABLA 12.1 Diferencias entre los códigos genéticos universal y mitocondrial

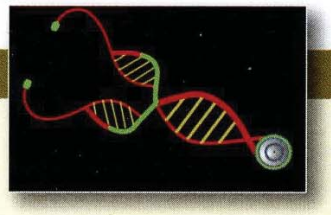
Codón	Código universal	Código mitocondrial humano
UGA	Terminación	Trp
AGA	Arg	Terminación
AGG	Arg	Terminación
AUA	Ile	Met

En las mitocondrias de las levaduras y las plantas hay otros codones del código universal.

este orgánulo. Los dos ARNr son los únicos componentes de ARN de los ribosomas mitocondriales de los animales y levaduras, mientras que los ribosomas bacterianos contienen tres ARNr (23S, 16S y 5S). Sin embargo, el ADN mitocondrial de las plantas también codifica un tercer ARNr de 5S. Las mitocondrias de las plantas y de los protozoos también difieren de las de los animales en que importan y utilizan ARNt codificados tanto por el genoma nuclear como por el mitocondrial, mientras que en las mitocondrias animales todos los ARNt son codificados por el orgánulo. A diferencia de los ARNr y ARNt codificados por el genoma mitocondrial, los genes nucleares codifican todas las proteínas necesarias para la transcripción y traducción, incluidas la ARN polimerasa mitocondrial, las proteínas ribosómicas y los factores de traducción.

El pequeño número de ARNt codificados por el genoma mitocondrial pone de manifiesto una característica importante del sistema genético mitocondrial —el uso de un código genético ligeramente diferente, que es distinto del código genético «universal» utilizado por las células procariotas y eucariotas (**Tabla 12.1**)—. Como ya se trató en el Capítulo 4, hay 64 codones posibles, de los cuales 61 codifican los 20 aminoácidos diferentes incorporados en las proteínas (véase Tabla 4.1). Muchos ARNt tanto en las células procariotas como en las eucariotas son capaces de reconocer más de un único codón en el ARNm debido al «balanceo», que permite el desapareamiento entre el anticodón del ARNt y la tercera posición de determinados codones complementarios (véase Fig. 9.3). Sin embargo, se requieren al menos 30 ARNt diferentes para traducir el código universal de acuerdo a las reglas del balanceo. Sin embargo, el ADN mitocondrial humano codifica sólo 22 especies de ARNt, y estos son los únicos ARNt que se utilizan para la traducción de los ARNm mitocondriales. Esto se lleva a cabo por una forma extrema de balanceo en la que la U en el anticodón del ARNt puede aparearse con cualquiera de las cuatro bases en la tercera posición del codón de ARNm, lo que permite que un único ARNt reconozca cuatro codones. Además, en las mitocondrias algunos codones especifican aminoácidos distintos de los que codifica el código universal.

Al igual que el ADN de los genomas nucleares, el ADN mitocondrial puede alterarse por mutaciones, que frecuentemente son nocivas para el orgánulo. Puesto que casi todas las mitocondrias del óvulo fecundado las aporta el oocito en vez del espermatozoide, las mutaciones germinales en el ADN mitocondrial son transmitidas a la siguiente generación por la madre. Dichas mutaciones se han asociado con varias enfermedades. Por ejemplo, la neuropatía óptica hereditaria de Leber, una enfermedad que conduce a la ceguera, puede producirse por mutaciones en los genes mitocondriales que codifican los componentes de la cadena de transporte de electrones. Además, se ha sugerido que la acumulación progresiva de mutaciones en el ADN mitocondrial durante la vida de los individuos contribuye al proceso de envejecimiento.



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedades de las mitocondrias: neuropatía óptica hereditaria de Leber

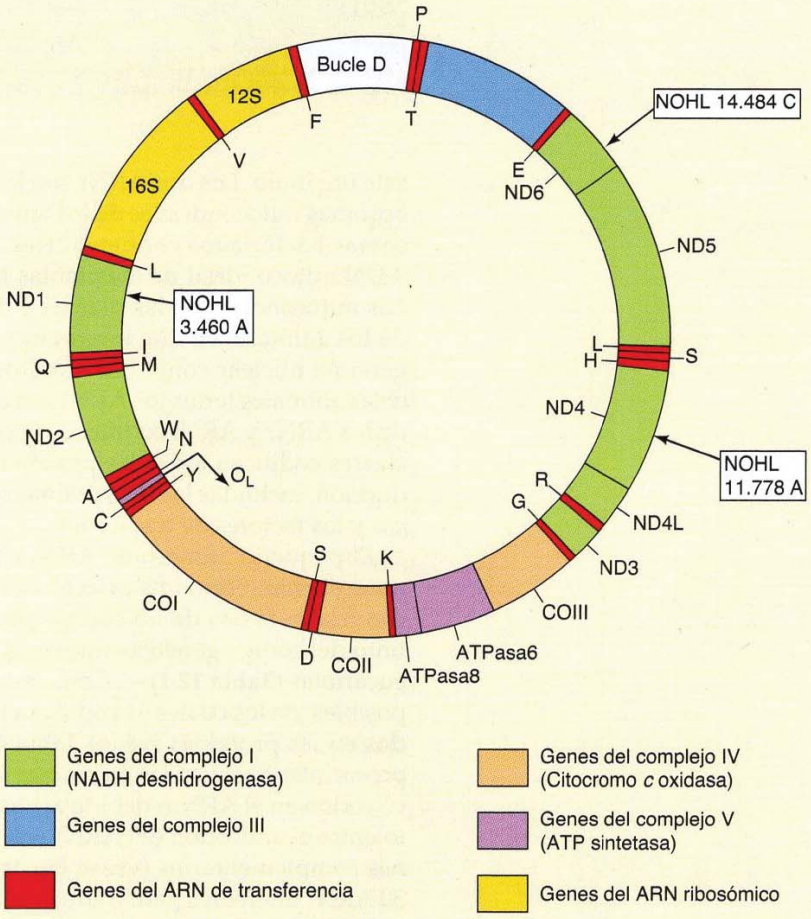
Enfermedad

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) es una enfermedad hereditaria poco frecuente que causa ceguera como consecuencia de la degeneración del nervio óptico. La pérdida de la visión suele ocurrir entre los 15 y los 35 años, y generalmente es la única manifestación de la enfermedad. No todos los individuos que heredan los defectos genéticos responsables de la NOHL desarrollan la enfermedad, y ésta afecta con menor frecuencia a las mujeres que a los hombres. Esta tendencia a afectar a los hombres podría sugerir que la NOHL es una enfermedad ligada al cromosoma X. Sin embargo, esto no es así, ya que los hombres nunca transmiten la NOHL a su descendencia. Por el contrario, la NOHL siempre es transmitida por la madre. Esta característica concuerda con una herencia de la NOHL citoplásmica en lugar de nuclear, ya que el citoplasma de los óvulos fecundados procede casi por completo del oocito.

Bases moleculares y celulares

En 1988 Douglas Wallace y sus colaboradores identificaron una mutación en el ADN mitocondrial de los pacientes con NOHL. Esta mutación (en el par de bases 11.778) afecta a una de las subunidades del complejo I de la cadena de transporte de electrones (NADH deshidrogenasa). Estudios posteriores han revelado que las mutaciones en tres de las subunidades de NADH deshidrogenasa codificada mitocondrial (véase la figura) suponen la mayor parte de los casos de NOHL.

Las mutaciones que producen la NOHL disminuyen la capacidad de las mitocondrias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa y generar ATP. Esto tiene su efecto principal en aquellos tejidos que son más dependientes de la fosforilación oxidativa, por lo que las alteraciones en los componentes de las mitocondrias darán lugar a manifestaciones clínicas en órganos específicos, en vez de a una enfermedad sistémica. El sistema nervioso central (incluyendo el cerebro y el nervio óptico) es muy dependiente del metabolismo oxidativo, por lo que concuerda que la ceguera sea la principal manifestación clínica de NOHL. Como ya se ha mencionado, la herencia de mutaciones de la NOHL no siempre conduce al desarrollo de la enfermedad; sólo alrededor del 10% de las mujeres y el 50% de los hombres que poseen una mutación sufren la pérdida de la visión. Como las mitocondrias se someten normalmente a procesos de fisión y fusión, las mezclas de genomas normales y defectuosos se distribuirán por las redes mitocondriales y las mitocondriales individuales de una célula. Muchas personas que tienen ADN mitocondriales predominantemente mutados no desarrollan la enfermedad, lo que indica que otros factores genéticos o ambientales, aún no identificados, son importantes en el desarrollo de la NOHL.



Prevención y tratamiento

La identificación de las mutaciones del ADN mitocondrial responsables de la NOHL permite el diagnóstico molecular de la enfermedad, el cual puede ser importante para establecer un diagnóstico definitivo de los pacientes sin antecedentes familiares. Sin embargo, la detección de mutaciones en el ADN mitocondrial es de escaso valor para localizar a los miembros de las familias afectadas o para una planificación familiar. Esto contrasta con la utilidad para detectar mutaciones congénitas de los genes nucleares, donde el análisis molecular puede determinar si un miembro de la familia o un embrión ha heredado un alelo mutante o normal. En la NOHL, sin embargo, las mitocondrias mutantes están presentes en un número elevado y son transmitidas por vía materna a

MEDICINA MOLECULAR

todos los descendientes. Como ya se ha dicho, no todos los descendientes desarrollan la enfermedad, pero esto no puede predecirse mediante el análisis genético.

El hallazgo de que la NOHL está producida por mutaciones del ADN mitocondrial hace pensar en el potencial de nuevos tratamientos. Una aproximación es el tratamiento metabólico dirigido a mejorar la fosforilación oxidativa mediante la administración de sustratos o cofactores de la vía de transporte de electrones, como succinato o coenzima Q. Alternativamente, los antioxidantes y los factores que promueven la supervivencia de las neuronas se están considerando como terapias para la NOHL. Por último, se han empezado a plantear estrategias de terapias génicas, incluida la posibilidad de reubicar un alelo de un gen normal en el núcleo. Se añadiría una señal apropiada para dirigir el producto del gen a la mitocondria, donde podría sustituir a la proteína codificada por la mitocondria defectuosa.

Referencias

Brown, M. D., D. S. Voljavec, M. T. Lott, I. MacDonald and D. C. Wallace. 1992. Leber's hereditary optic neuropathy: A model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J.* 6: 2791–2799.

Farrar, G. J., N. Chadderton, P. F. Kenna and S. Millington-Ward. 2013. Mitochondrial disorders: aetiologies, model systems, and candidate therapies. *Trends Genet.* 29: 488–497.

Internalización de proteínas y formación de las mitocondrias

Aunque sus genomas codifican sólo 13 proteínas, las mitocondrias de mamíferos contienen unas 1.500 proteínas diferentes que son codificadas por el genoma nuclear de la célula. A diferencia de lo que sucede con los ARN miembros del aparato de traducción de las mitocondrias (ARNr y ARNt), la mayoría de los genomas mitocondriales no codifican las proteínas requeridas para la replicación, transcripción o traducción del ADN. Los genes que codifican las proteínas requeridas para la replicación y expresión del ADN mitocondrial se encuentran en el núcleo. Además, el núcleo contiene los genes que codifican la mayoría de las proteínas mitocondriales requeridas para la fosforilación oxidativa y todas las enzimas que intervienen en el metabolismo mitocondrial (p. ej., las enzimas del ciclo del ácido cítrico). Algunos de estos genes fueron transferidos al núcleo desde el ancestro procariota original de las mitocondrias.

Las proteínas codificadas por los genes nucleares (aproximadamente el 99% de las proteínas mitocondriales) son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres e importadas en las mitocondrias como cadenas polipeptídicas completadas. Debido a la estructura de doble membrana de las mitocondrias, el importe de proteínas es considerablemente más complicado que la transferencia de un polipéptido a través de una bicapa fosfolipídica sencilla. Las proteínas dirigidas a la matriz deben cruzar tanto la membrana mitocondrial externa como la interna, mientras que otras proteínas deben ser enviadas a compartimentos distintos en el interior del orgánulo, incluidos la membrana interna, la externa, y el espacio intermembrana. Varias clases de señales directoras envían a las proteínas a estos compartimentos mitocondriales.

Las secuencias directoras más estudiadas son las **presecuencias** aminoterminales de 15 a 55 aminoácidos que dirigen la entrada de proteínas a la matriz mitocondrial, además de marcar a algunas proteínas para la membrana interna (**Fig. 12.5**). Las presecuencias de proteínas mitocondriales, caracterizadas por Gottfried Schatz, contienen múltiples aminoácidos cargados positivamente, por lo general en una hélice α anfipática, y son eliminadas mediante escisión proteolítica tras su introducción en el orgánulo. El primer paso de la introducción de proteínas es la unión de estas presecuencias a un complejo proteico en la superficie de las mitocondrias que dirige su translocación a través de la membrana externa (translocasa de la membrana externa, o **complejo Tom**). Tras su translocación a través del

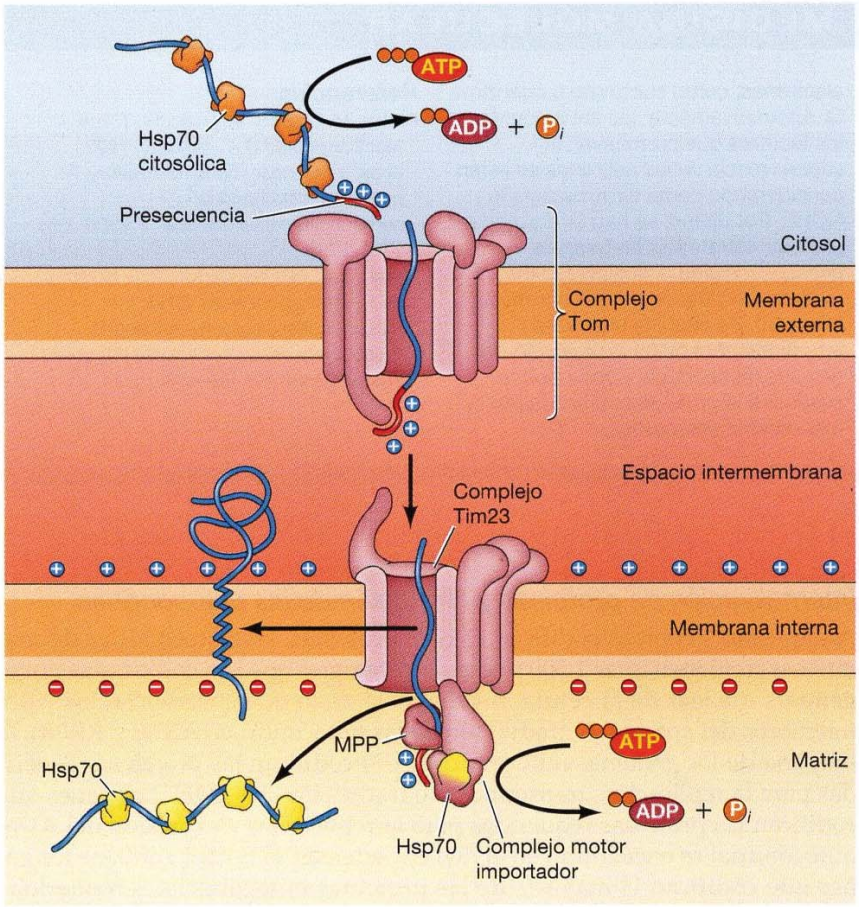


FIGURA 12.5 Introducción de proteínas con presecuencias en la mitocondria. Las proteínas son dirigidas al complejo Tom en la membrana mitocondrial externa mediante presecuencias amino terminal que tienen aminoácidos de carga positiva. Tras el paso por el complejo Tom, la presecuencia se une al complejo Tim23 de la membrana interna. En la matriz, un complejo motor importador que contiene una chaperona Hsp70 utiliza la hidrólisis de ATP para alimentar la translocación de la proteína a través de la membrana interna. Algunas proteínas con dominios transmembrana salen por el lateral de Tim23 a la membrana interna. Las proteínas destinadas a la matriz mitocondrial se asocian con chaperonas Hsp70 solubles que colaboran en su plegamiento. Las presecuencias son eliminadas por la peptidasa procesadora de la matriz (MPP) mitocondrial.

complejo Tom, estas proteínas son transferidas a un segundo complejo proteico, denominado Tim23, en la membrana interna (una de las dos *t*ranslocasas de la *m*embrana *i*nterna, o **complejos Tim**). A continuación, las proteínas de la matriz mitocondrial atraviesan la membrana interna a través de Tim23. De manera alternativa, algunas proteínas, que contienen una secuencia transmembrana, salen del canal de Tim23 por el lateral y se insertan en la membrana interna.

La translocación de las proteínas que contienen presecuencias a través de Tim23 requiere el potencial electroquímico establecido a través de la membrana mitocondrial interna en el transporte de electrones. Como se describe en el Capítulo 3, la transferencia de electrones de alta energía del NADH y $FADH_2$ al oxígeno molecular está acoplada a la transferencia de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Como los protones son partículas cargadas, esta transferencia establece un potencial eléctrico a través de la membrana interna: la matriz es negativa (véase Fig. 3.8). Durante la introducción de proteínas, este potencial eléctrico alimenta la translocación de la presecuencia, de carga positiva.

Para atravesar las membranas mitocondriales, las proteínas deben estar sin plegar, al menos parcialmente. En consecuencia, la entrada de proteínas a las mitocondrias precisa de chaperonas moleculares además de las proteínas de membrana implicadas en la translocación (véase Fig. 12.5). En la cara citosólica, los miembros de la familia de chaperonas Hsp70 mantienen las proteínas en un estado de plegado parcial y las presentan al complejo Tom. A medida que atraviesan la membrana interna, las cadenas polipeptídicas no plegadas se unen a otra chaperona Hsp70, componente de un complejo

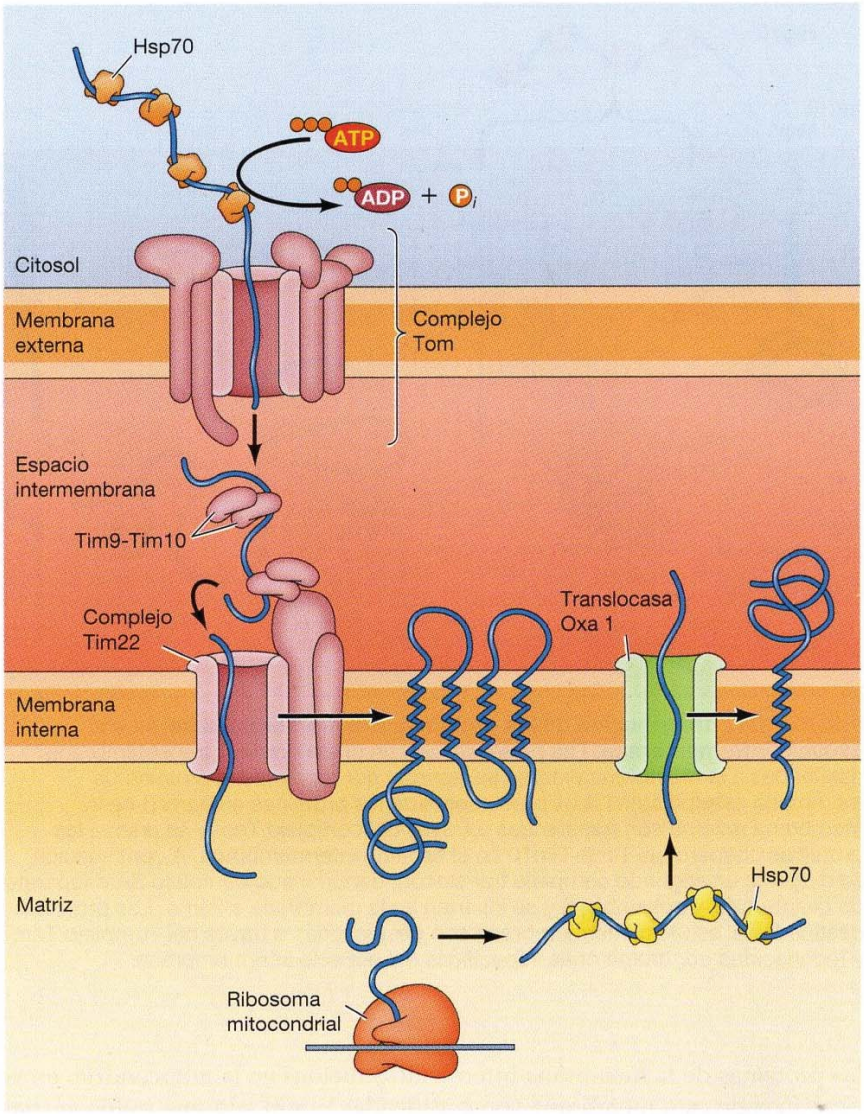


FIGURA 12.6 Marcado de las proteínas para ser dirigidas a la membrana mitocondrial interna. Las proteínas de la membrana interna con múltiples dominios transmembrana tienen secuencias señal internas, en vez de presecuencias *N* terminal. Tras su translocación a través de la membrana externa, estas proteínas se unen a las chaperonas móviles Tim9-Tim10 en el espacio intermembrana, que las transfieren al complejo Tim22 en la membrana interna. Las secuencias internas de la transmembrana detienen la translocación, y la proteína se transfiere lateralmente a la membrana interna. Algunas proteínas de la membrana interna están codificadas por el genoma mitocondrial. Estas se traducen en los ribosomas mitocondriales de la matriz y se dirigen a la membrana interna a través de la translocasa Oxa1.

motor dedicado a la introducción de proteínas. En estos casos, la presecuencia se escinde en ese momento por la **peptidasa procesadora de la matriz (MPP)** y la cadena polipeptídica se une a otras chaperonas de la matriz que facilitan su plegado.

Las proteínas pueden estar dirigidas a la membrana interna no solo por las presecuencias, sino también gracias a otras señales (**Fig. 12.6**). Muchas proteínas de la membrana interna son proteínas transmembrana de paso múltiple que funcionan como transportadores para intercambiar iones y nucleótidos entre las mitocondrias y el citosol. Estas proteínas no contienen presecuencias, sino que poseen múltiples señales internas de introducción a las mitocondrias. Las proteínas marcadas con estas secuencias atraviesan la membrana externa a través del complejo Tom, pero en vez de transferirse a Tim23, son reconocidas por chaperonas móviles (Tim9-Tim10) en el espacio intermembrana. Entonces, las chaperonas Tim9-Tim10 escoltan a estas proteínas a la segunda translocasa de la membrana interna (Tim22). A continuación, las proteínas son translocadas parcialmente a través de Tim22 antes de que las secuencias transmembrana internas provoquen su salida por el lateral del poro Tim22 y su inserción en la membrana interna. Además de

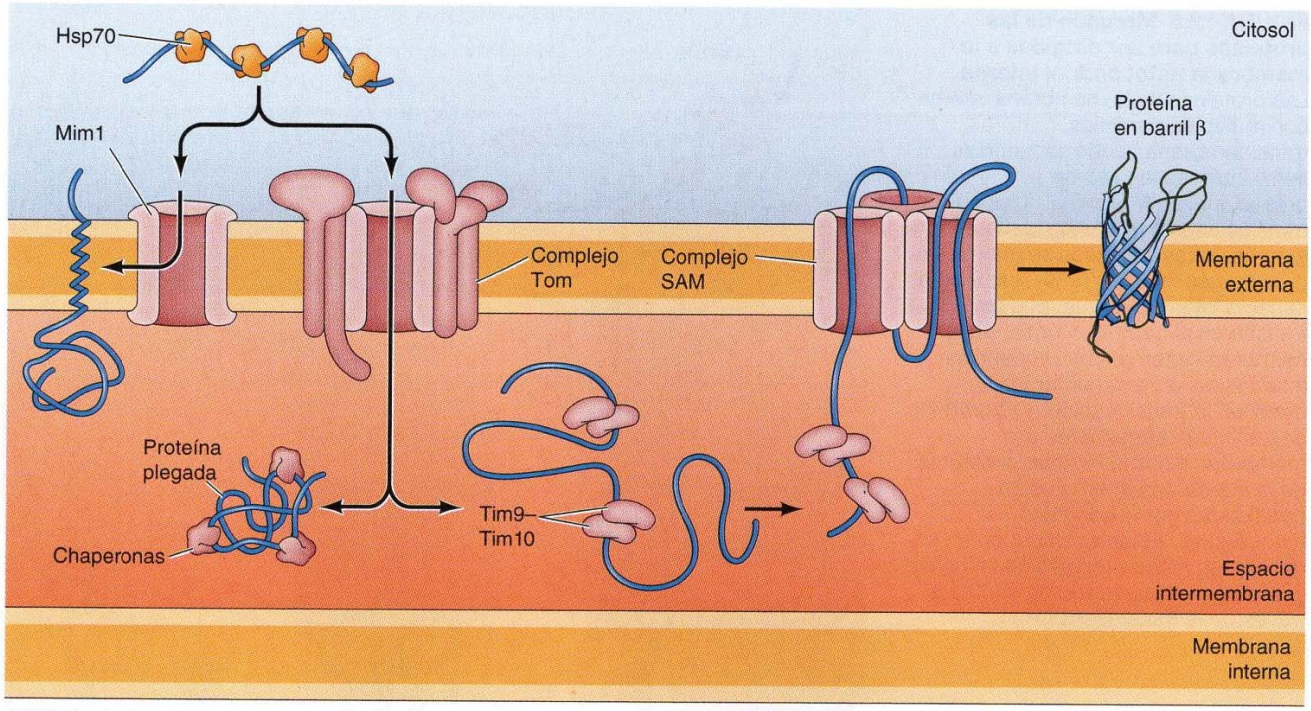


FIGURA 12.7 Distribución de las proteínas a la membrana externa y el espacio intermembrana. Las proteínas con un único dominio transmembrana destinadas a la membrana externa se insertan por medio de la proteína de membrana externa Mim1. Los precursores de las proteínas en barril β de la membrana externa son transferidas a través del complejo Tom y se unen a las proteínas chaperonas Tim9-Tim10 en el espacio intermembrana. A continuación, se dirigen a un segundo complejo translocón, denominado complejo SAM (aparato de distribución y ensamblaje) y se insertan en la membrana externa. Las proteínas destinadas al espacio intermembrana son desplazadas a través del complejo Tom y reconocidas por chaperonas específicas del espacio intermembrana.

las proteínas de la membrana interna introducidas en la mitocondria, otras proteínas de esta membrana son codificadas por el genoma mitocondrial (véase Fig. 12.4). Estas proteínas se sintetizan en los ribosomas de la matriz mitocondrial y son marcadas para dirigirse a la translocasa Oxa1 en la membrana interna, que está relacionada con un sistema de inserción en membranas bacterianas. Posteriormente, las proteínas son desplazadas de la zona de la matriz hacia el espacio intermembrana, y salen de Oxa1 por el lateral para insertarse en la membrana interna.

Las proteínas destinadas a la membrana externa o el espacio intermembrana también se introducen en la mitocondria a través del complejo Tom (**Fig. 12.7**). Muchas proteínas de la membrana externa (p. ej., porinas) son proteínas en barril β (véase Fig. 2.35), que atraviesan el complejo Tom hacia el espacio intermembrana. A continuación son reconocidas por las chaperonas móviles Tim9-Tim10 y transportadas a un segundo complejo translocón, denominado complejo SAM (aparato de ensamblaje y distribución), que media su inserción en la membrana externa. Además, algunas proteínas de la membrana externa con dominios de transmembrana de hélice α se insertan en la membrana por medio de una vía diferente mediada por la proteína de la membrana externa Mim1. Las proteínas son marcadas para dirigirse al espacio intermembrana mediante secuencias ricas en cisteína, reconocidas por chaperonas específicas una vez que las proteínas han salido del complejo Tom.

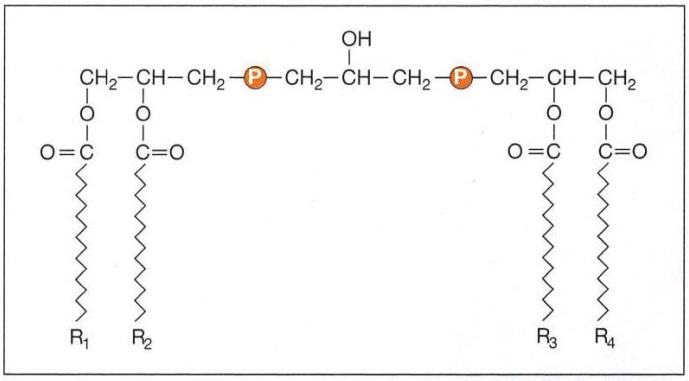


FIGURA 12.8 Estructura de la cardiolipina. La cardiolipina es un fosfolípido «doble» poco frecuente, que se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial interna.

Lípidos mitocondriales

No sólo las proteínas, sino también la mayoría de los lípidos de las membranas mitocondriales, son importados desde el citosol. En las células animales, los esfingolípidos, el colesterol, la fosfatidilcolina, el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina son sintetizados en el RE y transportados a las mitocondrias. Después, las mitocondrias sintetizan fosfatidiletanolamina a partir de fosfatidilserina. Las mitocondrias catalizan también la síntesis del infrecuente fosfolípido **cardiolipina**, que contiene cuatro cadenas de ácidos grasos (**Fig. 12.8**). La cardiolipina está situada en la membrana interna de las mitocondrias, donde actúa para mejorar la eficacia de la fosforilación oxidativa, en parte restringiendo el flujo de protones a través de la membrana.

La transferencia de lípidos entre el RE y las mitocondrias tiene lugar en puntos de contacto estrecho entre el RE y las membranas mitocondriales y, según se piensa, está mediada por las **proteínas de transferencia de fosfolípidos**, que extraen moléculas de fosfolípidos individuales de la membrana del RE (**Fig. 12.9**). El lípido puede ser transportado a continuación a través del entorno acuoso del citosol, se sumerge en un sitio de unión hidrófobo de la proteína y es liberado cuando el complejo llega a una nueva membrana, por ejemplo, de las mitocondrias. Los lípidos se intercambian entre las membranas externa e interna mitocondriales en los puntos de contacto entre ellas.

Transporte de metabolitos a través de la membrana interna

La función de las mitocondrias en la generación de energía metabólica requiere el transporte eficiente de moléculas pequeñas a, y desde las mitocondrias. Por ejemplo, el ATP sintetizado en las mitocondrias debe exportarse al citosol, mientras que el ADP y el P_i han de importarse desde el citosol para que prosiga la síntesis de ATP. La membrana externa de las mitocondrias es permeable libremente para las moléculas pequeñas, pero muchas proteínas de la membrana interna son transportadores de moléculas pequeñas (véase Fig. 21.6). La energía necesaria para activar el transporte de moléculas pequeñas a, y desde las mitocondrias es proporcionada por el gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna durante el proceso de fosforilación oxidativa (véanse Figs. 3.6 y 3.7).

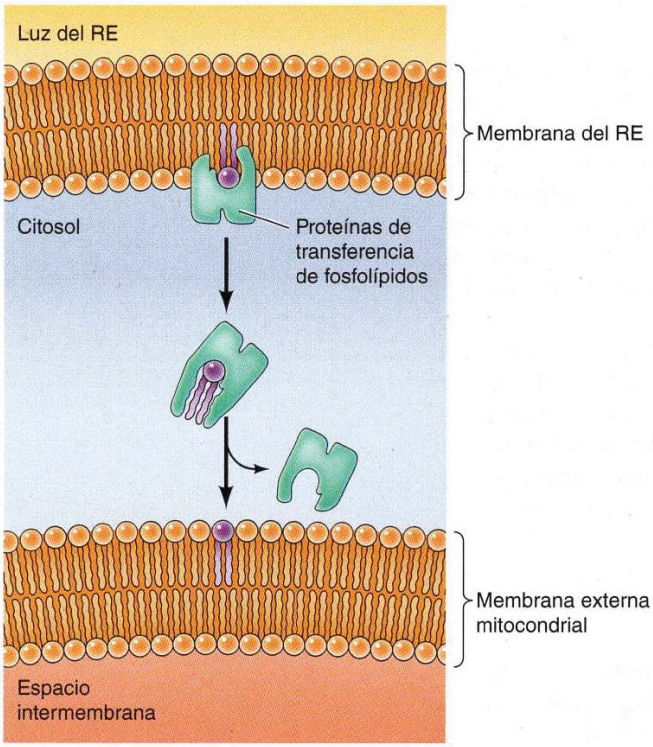


FIGURA 12.9 Proteínas de transferencia de fosfolípidos. Las proteínas de transferencia de fosfolípidos extraen moléculas de fosfolípidos de la membrana del retículo endoplásmico (RE) y las transportan a la membrana externa mitocondrial.

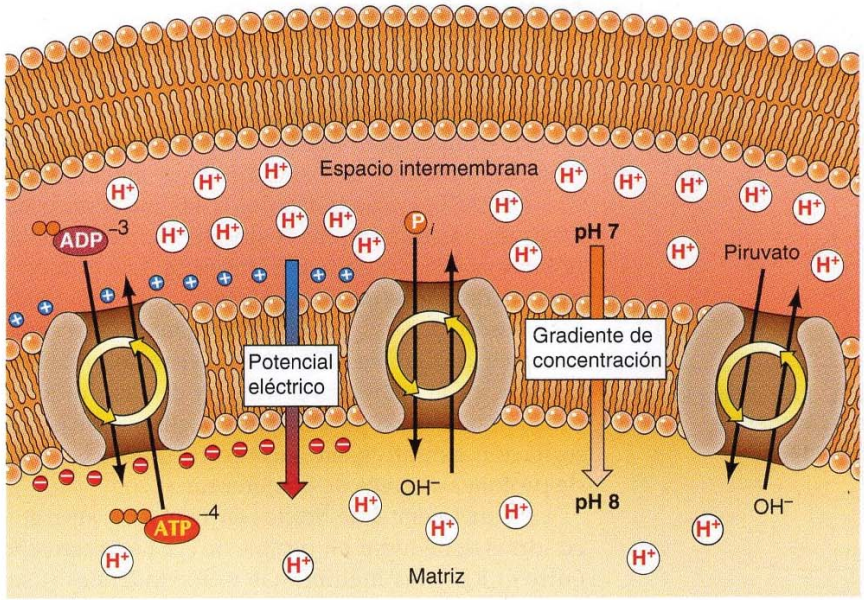


FIGURA 12.10 Transporte de metabolitos a través de la membrana interna mitocondrial. El transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana interna mitocondrial está mediado por proteínas transportadoras que atraviesan la membrana y está dirigido por el gradiente electroquímico. Por ejemplo, el ATP es exportado desde las mitocondrias al citosol mediante un transportador que lo intercambia por ADP. El componente eléctrico del gradiente electroquímico dirige este intercambio: el ATP tiene una mayor carga negativa (–4) que el ADP (–3), por lo que el ATP es exportado desde la matriz mitocondrial al citosol mientras que el ADP es importado a la mitocondria. Por el contrario, el transporte de fosfato (P_i) y de piruvato está acoplado a un intercambio de iones hidroxilo (OH^-); en este caso el componente de pH del gradiente electroquímico dirige la exportación de iones hidroxilo, acoplada al transporte de P_i y piruvato al interior de las mitocondrias.

Tal como se indica en el Capítulo 3, el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna tiene componentes químicos y eléctricos, y los dos se utilizan para impulsar el transporte de metabolitos (**Fig. 12.10**). Por ejemplo, el transporte de ATP y ADP a través de la membrana interna está mediado por una proteína integral de membrana, el transportador de nucleótidos de adenina, que transporta una molécula de ADP al interior de la mitocondria a cambio de una molécula de ATP transferida desde la mitocondria al citosol. Debido a que el ATP tiene una carga negativa mayor que el ADP (–4 en comparación con –3), este intercambio está dirigido por el componente eléctrico del gradiente electroquímico. Puesto que el gradiente de protones establece una carga positiva en el lado citosólico de la membrana, el intercambio de ATP por ADP es energéticamente favorable.

Además de ADP, la síntesis de ATP en la mitocondria también requiere iones fosfato (P_i), por lo que también debe importarse P_i desde el citoplasma. Esto lo realiza otra proteína transportadora de membrana, que importa fosfato ($H_2PO_4^-$) y exporta iones hidroxilo (OH^-). Este intercambio es eléctricamente neutro porque tanto los iones fosfato como los iones hidroxilo tienen una carga de –1. Sin embargo, el intercambio está dirigido por el gradiente de la concentración de protones; el pH más elevado en el interior de las mitocondrias se corresponde con una mayor concentración de iones hidroxilo, lo que favorece su translocación al lado citosólico de la membrana.

La energía del gradiente electroquímico se utiliza de forma similar para dirigir el transporte de otros metabolitos al interior de las mitocondrias. Por ejemplo, el transporte de piruvato desde el citoplasma (donde se produce por la glicólisis) al interior de la mitocondria está mediado por un transportador que intercambia piruvato por iones hidroxilo. Otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico son capaces de ir y venir entre las mitocondrias y el citosol mediante mecanismos de intercambio similares.

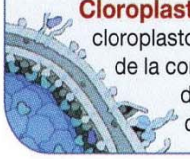
Cloroplastos y otros plástidos

Los **cloroplastos**, los orgánulos responsables de la fotosíntesis, son similares a las mitocondrias en muchos aspectos. Tanto los cloroplastos como las mitocondrias tienen como función generar energía metabólica, evoluciona-

ron mediante endosimbiosis, contienen su propio sistema genético y se replican por división. Sin embargo, los cloroplastos son más grandes y más complejos que las mitocondrias, y desempeñan varias funciones críticas además de generar ATP. Los cloroplastos son responsables de la conversión fotosintética de CO_2 en carbohidratos. Además, los cloroplastos sintetizan aminoácidos, ácidos grasos y los componentes lipídicos de sus propias membranas. En los cloroplastos también tiene lugar la reducción de nitrito (NO_2^-) a amoniaco (NH_3), una etapa esencial en la incorporación de nitrógeno a los compuestos orgánicos. Es más, los cloroplastos son sólo uno de los diferentes tipos de orgánulos relacionados (plástidos) que desempeñan diversos papeles en las células vegetales.

VÍDEO 12.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v12.3



Cloroplastos en *Elodea*. Los cloroplastos son responsables de la conversión fotosintética de CO_2 en carbohidratos.

Estructura y función de los cloroplastos

Los cloroplastos de las plantas son orgánulos grandes (5 a 10 µm de longitud) que, como las mitocondrias, están delimitados por una doble membrana denominada la envuelta del cloroplasto (**Fig. 12.11**). Además de las membranas interna y externa de la envuelta, los cloroplastos tienen un tercer sistema de membranas interno, denominado la membrana del tilacoide. La **membrana del tilacoide** forma una red de discos aplanados denominados tilacoides, que suelen estar organizados en apilamientos denominados *grana*. Debido a esta estructura de membrana triple, la organización interna de

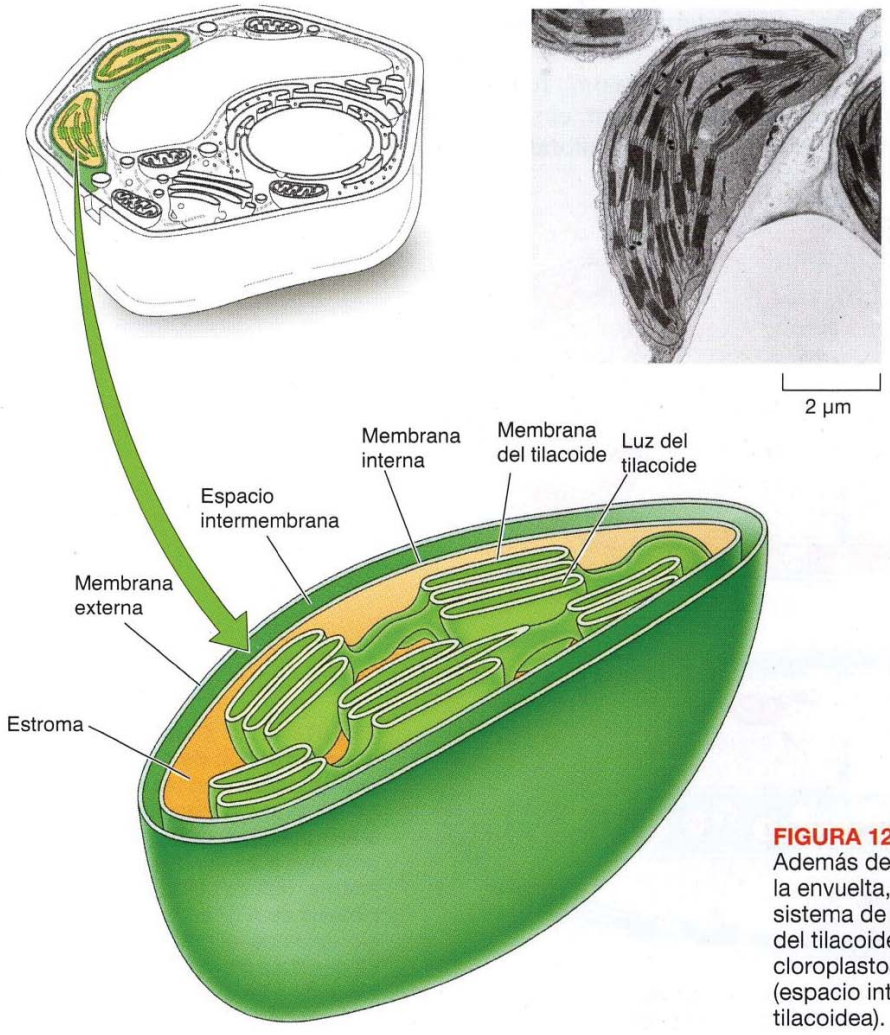


FIGURA 12.11 Estructura de un cloroplasto. Además de las membranas interna y externa de la envuelta, los cloroplastos contienen un tercer sistema de membranas internas: la membrana del tilacoide. Estas membranas dividen a los cloroplastos en tres compartimentos internos (espacio intermembrana, estroma, y luz tilacoidea).

los cloroplastos es más compleja que la de las mitocondrias. Concretamente, sus tres membranas dividen a los cloroplastos en tres compartimentos internos diferentes: 1) el espacio intermembrana entre las dos membranas de la envoltura del cloroplasto; 2) el **estroma**, que se dispone dentro de la envuelta pero por fuera de la membrana del tilacoide, y 3) la luz del tilacoide.

A pesar de su mayor complejidad, las membranas de los cloroplastos tienen similitudes funcionales claras con las de las mitocondrias —como era de esperar, dado el papel de ambos orgánulos en la generación de ATP—. La membrana externa de la envuelta del cloroplasto, como la de la mitocondria, contiene porinas y, por tanto, es permeable a las moléculas pequeñas. Por el contrario, la membrana interna es impermeable a iones y a metabolitos, que sólo podrán entrar en los cloroplastos a través de transportadores específicos de membrana. Estas propiedades de las membranas interna y externa de la envuelta del cloroplasto son similares a las de las membranas interna y externa de las mitocondrias: en ambos casos la membrana interna restringe el paso de moléculas entre el citosol y el interior del orgánulo. El estroma del cloroplasto también equivale funcionalmente a la matriz mitocondrial: contiene el sistema genético del cloroplasto y diversas enzimas metabólicas, incluyendo las responsables de la conversión crítica de CO_2 en carbohidratos durante la fotosíntesis.

La principal diferencia entre los cloroplastos y las mitocondrias, tanto en términos de estructura como de función, es la membrana del tilacoide. Esta membrana tiene una importancia fundamental en los cloroplastos, donde realiza el papel de la membrana mitocondrial interna en el transporte de electrones y en la generación de ATP (**Fig. 12.12**). La membrana interna de la envuelta del cloroplasto (que no está plegada en crestas) no funciona en el transporte electrónico ni en la fotosíntesis. En su lugar, el sistema de transporte de electrones del cloroplasto se localiza en la membrana del tila-

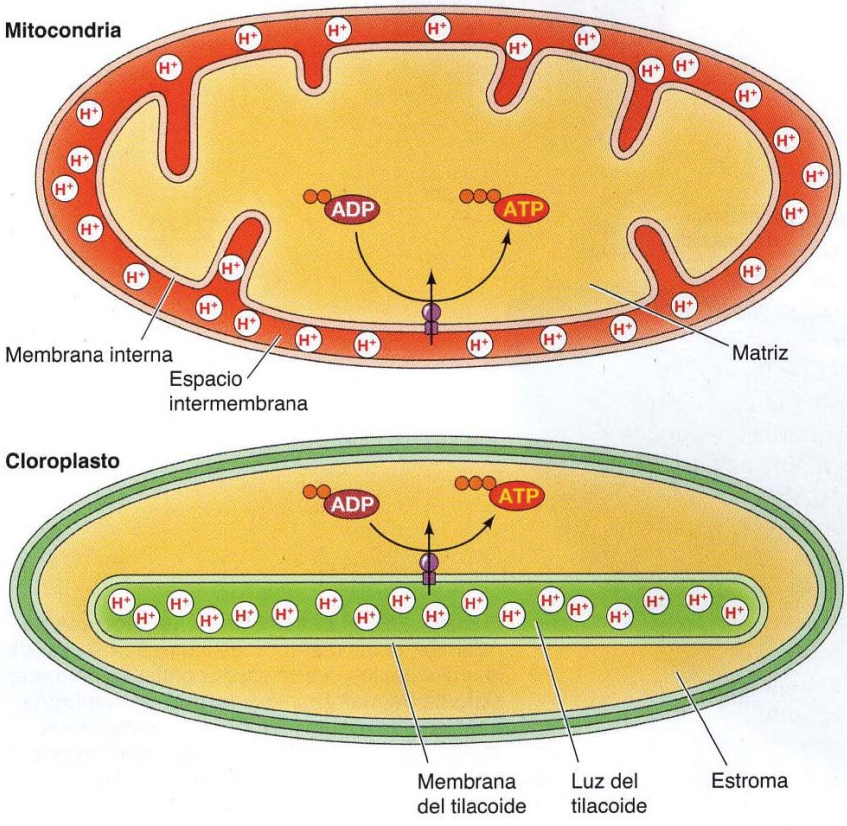


FIGURA 12.12 Generación quimiosmótica de ATP en los cloroplastos y en las mitocondrias. En las mitocondrias, el transporte de electrones genera un gradiente de protones a través de la membrana interna, que se utiliza para dirigir la síntesis de ATP en la matriz. En los cloroplastos, el gradiente de protones se genera a través de la membrana del tilacoide y se utiliza para dirigir la síntesis de ATP en el estroma.

TABLA 12.2 Genes codificados por el ADN del cloroplasto

Función	Número de genes
Genes para el aparato genético	
ARNr (23S, 16S, 5S, 4,5S)	3
ARNt	30
Proteínas ribosómicas	40
Subunidades de la ARN polimerasa	4
Genes para la fotosíntesis	
Fotosistema I	8
Fotosistema II	18
Complejo del citocromo *bf*	8
ATP sintetasa	8
NADP reductasa dehidrogenasa	11
Metabolismo	11
Plegamiento de proteínas e inserción de membranas	14

coide, y los protones son bombeados a través de esta membrana desde el estroma hacia la luz del tilacoide. El gradiente electroquímico resultante dirige la síntesis de ATP a medida que los protones retornan hacia el estroma. Por tanto, en cuanto a su papel en la generación de energía metabólica, la membrana del tilacoide de los cloroplastos equivale a la membrana interna de las mitocondrias.

Genoma del cloroplasto

Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos contienen su propio sistema genético, lo que refleja su origen evolutivo a partir de bacterias fotosintéticas. Los genomas de los cloroplastos son similares a los de las mitocondrias en el sentido de que consisten en moléculas de ADN circular presentes en múltiples copias en cada orgánulo. Sin embargo, el genoma de los cloroplastos es más grande y más complejo que el de las mitocondrias, oscilando entre 100 y 200 kb y con un contenido aproximado de 150 genes.

Aunque existe una variabilidad considerable entre los genomas de cloroplastos de distintas especies, en general incluyen un conjunto común de genes, que incluye tanto ARN como proteínas que intervienen en la expresión génica, así como varias proteínas implicadas en la fotosíntesis y el metabolismo (**Tabla 12.2**). Tanto los ARN ribosómicos como los de transferencia utilizados para la traducción de los ARNm del cloroplasto son codificados por el genoma del orgánulo. Estos incluyen tres ARNr (23S, 16S y 5S), similares a los ARNr bacterianos y los ARNt 27-31. A diferencia de lo que ocurría con el menor número de ARNt codificados por el genoma mitocondrial, los ARNt del cloroplasto son suficientes para que se traduzcan todos los codones del ARNm según el código genético universal. Además de estos componentes de ARN del sistema de traducción, el genoma del cloroplasto codifica alrededor de 40 proteínas ribosómicas, que representan la mayoría de las proteínas de los ribosomas del cloroplasto. Al menos tres de las cuatro subunidades de ARN polimerasa bacteriana son también codificadas por genomas de cloroplastos, aunque en el núcleo se codifican factores adicionales necesarios para la expresión génica de los cloroplastos.

El genoma del cloroplasto también codifica aproximadamente 50 proteínas que intervienen en la fotosíntesis, incluyendo componentes de los fotosistemas I y II, componentes del complejo del citocromo *bf*, componentes de la ATP sintetasa y proteínas que intervienen en la fotosíntesis, entre ellas los componentes de los fotosistemas I y II, del complejo citocromo *bf*, de la ATP

sintasa y de la NADP reductasa deshidrogenasa (véase Fig. 3.13). Genes adicionales en los cloroplastos codifican proteínas implicadas en el metabolismo, el plegamiento de proteínas y la inserción de membranas. Debe mencionarse que una de las subunidades de la *ribu*losa bisfosfato *c*arboxilasa/*o*xigenasa (rubisco) está codificada por el ADN del cloroplasto. Rubisco es la enzima crítica que cataliza la adición de CO_2 a la ribulosa-1,5-bifosfato durante el ciclo de Calvin (véase Fig. 3.15). No sólo es el principal componente de las proteínas del estroma del cloroplasto, sino que también se considera que es la proteína más abundante de la Tierra.

Internalización y distribución de las proteínas del cloroplasto

Aunque los cloroplastos codifican más proteínas propias que las mitocondrias, alrededor de 3.000 o el 95% de las proteínas del cloroplasto las codifican los genes nucleares. Como ocurre en las mitocondrias, estas proteínas son sintetizadas en los ribosomas citosólicos y después pasan al interior del cloroplasto como cadenas polipeptídicas completas. A continuación han de distribuirse a sus localizaciones apropiadas en el cloroplasto —una tarea más complicada incluso que la distribución de las proteínas en las mitocondrias, ya que los cloroplastos contienen tres membranas separadas que los divide en tres compartimentos internos distintos.

Las proteínas son dirigidas para entrar en los cloroplastos mediante unas secuencias *N*-terminales de 30 a 100 aminoácidos denominadas **péptidos de**

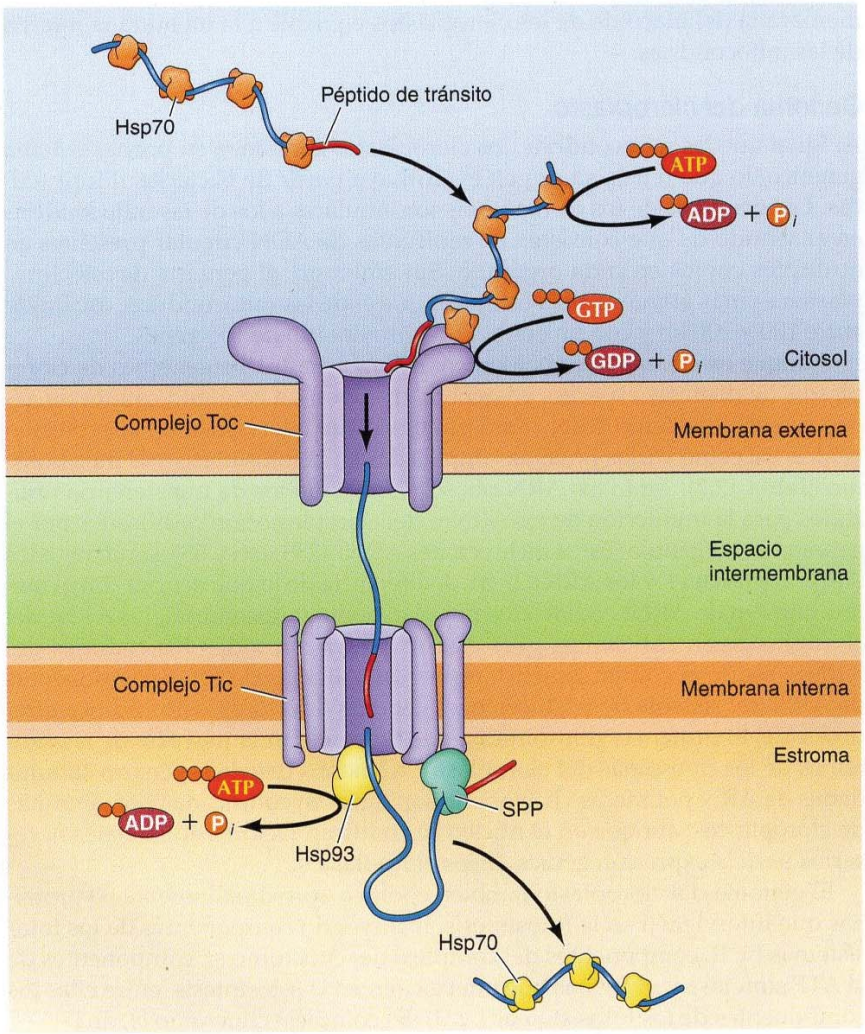


FIGURA 12.13 Internalización de proteínas al estroma del cloroplasto. Las proteínas con péptidos de tránsito N-terminales se dirigen al complejo Toc, en la membrana externa del cloroplasto. El paso por la membrana externa precisa la hidrólisis de ATP por parte de la Hsp70 y la hidrólisis de GTP por proteínas Toc. Una vez que ha atravesado la membrana externa del cloroplasto, el péptido de tránsito pasa al complejo Tic en la membrana interna. La proteína es arrastrada a través del complejo Tic por la acción de Hsp93 y el péptido de tránsito es eliminado por la peptidasa procesadora estromal (SPP).

tránsito, que dirigen el transporte de las proteínas a través de las dos membranas de la envoltura del cloroplasto, y que después son eliminadas mediante escisión proteolítica (**Fig. 12.13**). Los péptidos de tránsito dirigen las proteínas a la translocasa de la membrana externa del cloroplasto (**complejo Toc**). A diferencia de las presecuencias necesarias para la internalización de proteínas en las mitocondrias, los péptidos de tránsito no tienen cargas positivas y la membrana interna del cloroplasto carece de un potencial eléctrico fuerte. La introducción de proteínas en los cloroplastos precisa moléculas Hsp70 para mantener a la proteína en un estado no plegado. Además, algunas proteínas Toc se unen al GTP y lo hidrolizan, lo que supone una fuente de energía adicional para la translocación. Una vez transportadas las proteínas a través del complejo Toc, se transfieren a la translocasa de la membrana interna del cloroplasto (**complejo Tic**) y se transportan al estroma. Una chaperona Hsp93 del cloroplasto, asociada a la cara estromal del complejo Tic, traslada la preproteína a través de la membrana interna. En el estroma, el péptido de tránsito es escindido por una **peptidasa procesadora estromal (SPP)**, y la proteína se asocia con las chaperonas Hsp70 del estroma.

Las vías para la incorporación de proteínas en las membranas de la envuelta de cloroplastos no se conocen bien. Las proteínas de las membranas externas no tienen péptidos de tránsito y se encaminan directamente a la membrana, donde el canal Toc parece mediar en su integración. Algunas proteínas de membrana interna son importadas por el complejo Toc y después dirigidas a la membrana interna por dominios de transmembrana que promueven su salida lateral desde el canal Tic. Otras proteínas de membrana interna son primero importadas en el estroma y después redirigidas a la membrana interna, de forma similar a algunas proteínas de membrana interna de las mitocondrias (véase Fig. 12.6). Sin embargo, la maquinaria de cloroplastos que media en esta vía no se ha caracterizado aún.

Las proteínas dirigidas a la luz del tilacoide son transportadas en dos etapas. Primero se transportan al estroma, como se ha descrito, y después se

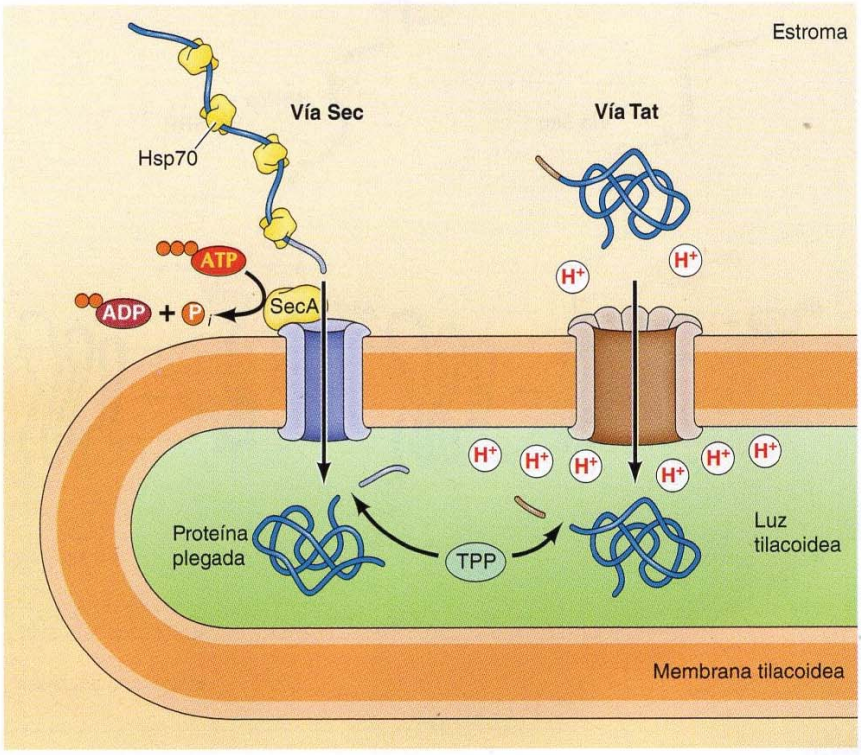


FIGURA 12.14 Importe de proteínas en la luz tilacoidea. Dos vías transfieren proteínas desde el estroma a la luz tilacoidea. En la vía Sec, la proteína SecA reconoce una secuencia señal tilacoidea y dirige la proteína al translocón Sec, empleando energía derivada de la hidrólisis de ATP para transferir la proteína a la luz. En la vía de translocación de doble arginina (Tat: *twin-arginintranslocation*), una secuencia de transferencia tilacoidea que contiene dos argininas cerca del extremo amino terminal, dirige la proteína completamente plegada al translocón Tat, que los transfiere a la luz del tilacoide usando energía obtenida del gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. En la luz, las secuencias de tilacoide se escinden por la acción de una proteasa de procesamiento del tilacoide (PPT).

dirigen para translocación a través de la membrana del tilacoide por una segunda secuencia señal, que se expone después a escisión del péptido de tránsito. Así pues, para transportar proteínas desde el estroma a la luz del tilacoide intervienen dos vías diferentes (**Fig. 12.14**). La vía Sec evolucionó desde la vía utilizada para la secreción de proteínas por bacterias y, por tanto, se encuentra relacionada también con la vía utilizada para la translocación de proteínas en el retículo endoplásmico (como se aborda en el Capítulo 11). En esta vía, la secuencia señal tilacoidea es reconocida por la proteína SecA y translocada como una proteína no plegada a través del translocón Sec de una forma dependiente del ATP. La segunda vía utilizada por los cloroplastos, la vía de translocación de arginina doble (Tat), también está relacionada con un sistema de translocación de membrana bacteriana. En esta vía, las proteínas son reconocidas por una secuencia señal de arginina doble y transportadas a través de la membrana del tilacoide en un estado totalmente plegado. La energía para el transporte en la vía Tat es proporcionada por el gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. En las dos vías, las secuencias señal tilacoideas son escindidas por la proteasa de procesamiento del tilacoide (PPT) en la luz del tilacoide.

Las proteínas pueden dirigirse a la membrana del tilacoide por al menos tres vías (**Fig. 12.15**). En primer lugar, algunas proteínas con una secuencia transmembrana pueden salir del translocón Sec en sentido lateral. Alternativamente, algunas proteínas se incorporan en la membrana del tilacoide por medio de la maquinaria de inserción Alb3, que está relacionada con Oxa1 de la membrana interna mitocondrial (véase Fig. 12.6). Estas proteínas se dirigen a Alb3 por medio de una partícula de reconocimiento de señal de

◆ A diferencia de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) que dirige las proteínas al retículo endoplásmico, la SRP del cloroplasto (SRPcp) no contiene ningún componente de ARN. (Véase Cap. 11).

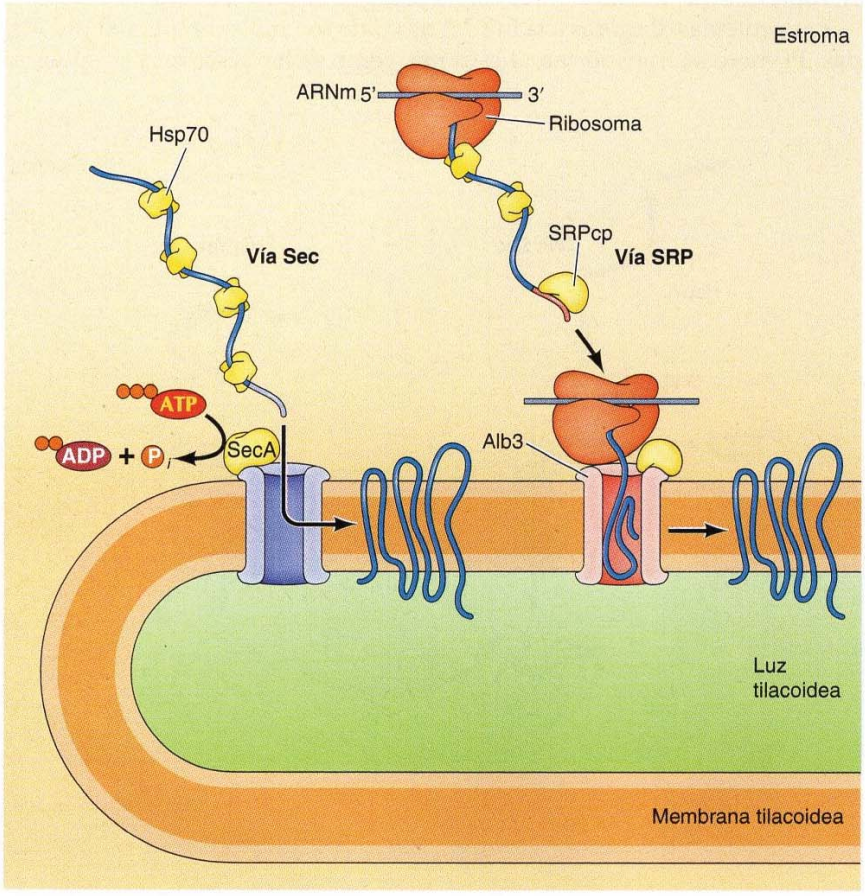


FIGURA 12.15 Direccionamiento de proteínas a la membrana tilacoidea. Algunas proteínas transmembrana salen de la translocasa Sec lateralmente mediante la incorporación en la membrana tilacoidea. Otras proteínas transmembrana, que pueden importarse desde el estroma o ser sintetizadas por los ribosomas de los cloroplastos en el estroma, son reconocidas por la partícula de reconocimiento de señal de los cloroplastos (SRPcp) y se insertan en la membrana tilacoidea por la acción de la translocasa Alb3.

cloroplastos (SRPcp), que también puede dirigir las proteínas de la membrana del tilacoide que están codificadas por el genoma de cloroplastos y traducidas por ribosomas en el estroma. Finalmente, la inserción de muchas proteínas de la membrana del tilacoide es independiente de las vías Sec o SRP y puede producirse mediante un mecanismo «espontáneo» en el que no interviene ninguna maquinaria de transporte conocida.

Otros plástidos

Los cloroplastos son sólo uno de los miembros, aunque el más importante, de una familia más amplia de orgánulos vegetales denominados **plástidos**. Todos los plástidos contienen el mismo genoma que los cloroplastos, pero se diferencian tanto en la estructura como en la función. Los cloroplastos están especializados para la fotosíntesis y son únicos al contener el sistema interno de membranas del tilacoide. Otros plástidos, que intervienen en diversos aspectos del metabolismo de la célula vegetal (como la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos lípidos, hormonas vegetales, nucleótidos, vitaminas y metabolitos secundarios), están delimitados por las dos membranas de la envuelta del plástido pero carecen de las membranas del tilacoide y de otros componentes del aparato fotosintético.

Los diferentes tipos de plástidos se suelen clasificar en función de los tipos de pigmentos que contienen. Los cloroplastos se denominan así porque contienen clorofila. Los **cromoplastos** (**Fig. 12.16A**) no tienen clorofila pero contienen carotenos, y son responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de algunas flores y fruta. Los **leucoplastos** son plástidos no pigmentados que almacenan diversas fuentes de energía en los tejidos no fotosintéticos. Los **amiloplastos** (**Fig. 12.16B**) y los **elaioplastos** son ejemplos de leucoplastos que almacenan almidón y lípidos, respectivamente.

Todos los plástidos, incluidos los cloroplastos, proceden de los **proplástidos**, orgánulos pequeños (0,5 µm a 1 µm de diámetro) e indiferenciados, presentes en las células en división de las raíces y brotes de las plantas. Los proplástidos posteriormente dan lugar a los diversos tipos de plástidos maduros, en función de las necesidades de las células diferenciadas. Además, varios tipos de plástidos maduros son capaces de cambiar de un tipo a otro (**Fig. 12.17**). Por ejemplo, los cromoplastos se desarrollan a partir de los cloroplastos durante la maduración de la fruta (p. ej., los tomates). Durante

ANIMACIÓN 12.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a12.1

De proplástido a cloroplasto. Un proplástido con membranas interna y externa se desarrolla en un cloroplasto maduro con un tercer sistema de membranas: las membranas tilacoideas.

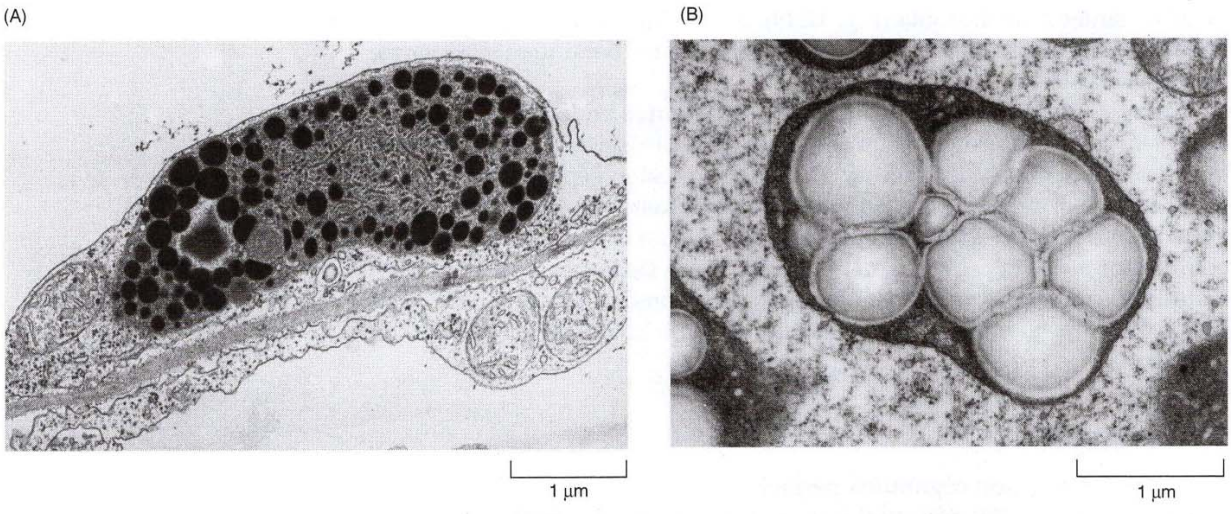


FIGURA 12.16 Microfotografías electrónicas de cromoplastos y amiloplastos. (A) Los cromoplastos contienen gotitas de lípidos donde se almacenan carotenos. (B) Los amiloplastos contienen gránulos grandes de almidón.

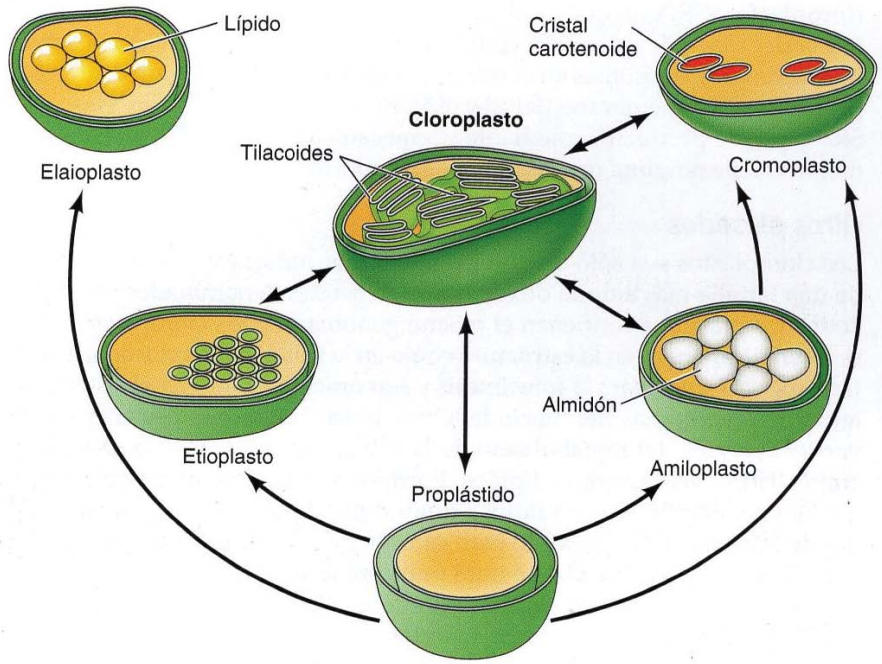


FIGURA 12.17 Interconversiones de plástidos. Los protoplástidos pueden desarrollarse en cloroplastos, cromoplastos, etioplastos, elaioplastos y amiloplastos. Los distintos plástidos pueden convertirse además en los demás tipos.

este proceso se descomponen la clorofila y la membrana del tilacoide, mientras que se sintetizan nuevos tipos de carotenos.

Una característica interesante de los plástidos es que su desarrollo está controlado por señales ambientales y por programas intrínsecos de diferenciación celular. Por ejemplo, en las células fotosintéticas de las hojas, los proplástidos dan lugar a los cloroplastos (**Fig. 12.18**). Durante este proceso la membrana del tilacoide se origina por gemación de vesículas a partir de la membrana interna de la envoltura del plástido, y se sintetizan y ensamblan los diferentes componentes del aparato fotosintético. Sin embargo, los cloroplastos sólo se desarrollan en presencia de luz. Si las plantas se mantienen en la oscuridad, el desarrollo de los proplástidos en las hojas se detiene en un estado intermedio (denominado **etioplasto**), en el que se ha formado una estructura semicristalina de membranas internas tubulares pero no se ha sintetizado clorofila (**Fig. 12.19**). Si las plantas cultivadas en la oscuridad se exponen entonces a la luz, los etioplastos continúan su desarrollo a cloroplastos.

Como la mayor parte de las proteínas presentes en los cloroplastos y otros plástidos están codificadas por genes nucleares, el control del desarrollo del plástido precisa la coordinación de la expresión génica entre el genoma nuclear y el del plástido. Así pues, los cloroplastos y otros plástidos envían señales al núcleo que regulan la transcripción de los genes nucleares codificadores de las proteínas del plástido, como las implicadas en la fotosíntesis. El conocimiento de los mecanismos responsables de la señalización de los plástidos al núcleo es un tema complejo en la biología molecular de las plantas.

Peroxisomas

Los **peroxisomas** son orgánulos pequeños (0,1-1 μm), rodeados por una membrana (**Fig. 12.20**) que contienen enzimas implicadas en diversas reacciones metabólicas, incluyendo varios aspectos del metabolismo energético. La mayoría de las células humanas contienen entre 100 y 1.000 peroxisomas, dependiento de la actividad metabólica de las células. Los peroxiso-

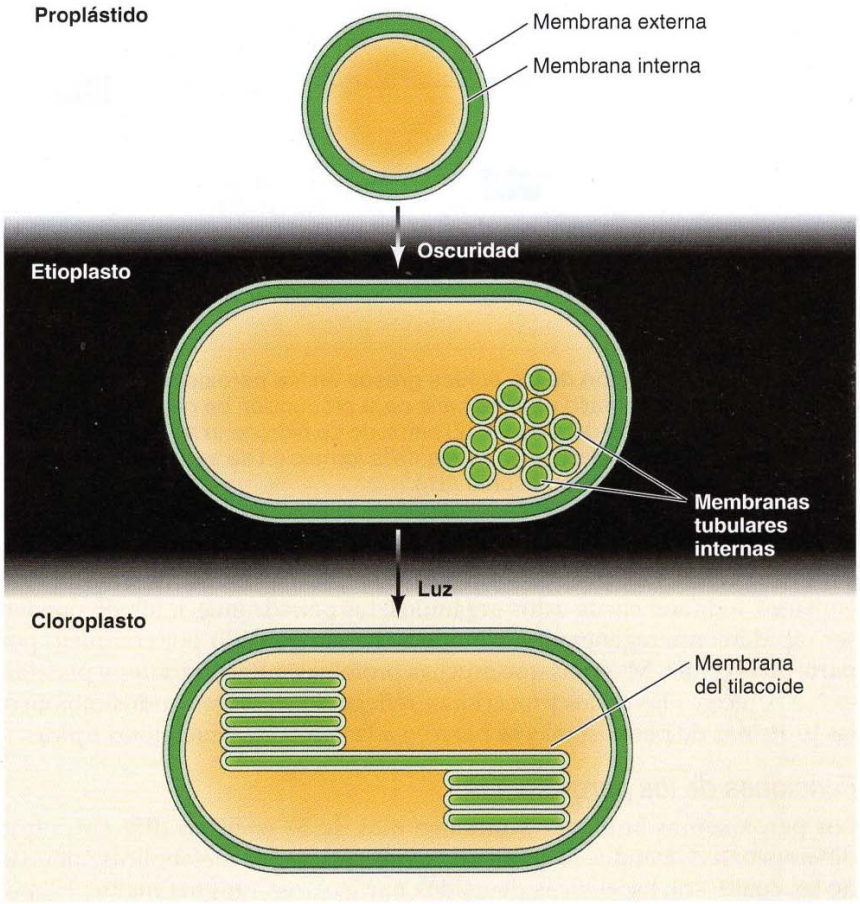


FIGURA 12.18 Desarrollo de los cloroplastos. Los cloroplastos se desarrollan a partir de los proplástidos en las células fotosintéticas de las hojas. Los proplástidos contienen sólo las membranas interna y externa de la envoltura; la membrana del tilacoide se forma por gemación de vesículas a partir de la membrana interna durante el desarrollo del cloroplasto. Si la planta se mantiene en la oscuridad, el desarrollo de los cloroplastos se detiene en un estadio intermedio (etioplastos). Los etioplastos no tienen clorofila y contienen unas estructuras semicristalinas de membranas tubulares. En presencia de luz, continúan su desarrollo hacia cloroplastos.

FIGURA 12.19 Microfotografía electrónica de un etioplasto.

mas no poseen su propio genoma y todas sus proteínas se codifican en el genoma nuclear. De manera similar a las mitocrondrias y los cloroplastos, la mayoría de las proteínas perosixómicas son sintetizadas sobre ribosomas libres y después importadas en los peroxisomas como cadenas polipeptídicas completas. Sin embargo, algunas proteínas de membrana son transferidas a peroxisomas desde el retículo endoplásmico. Al igual que las mitocondrias

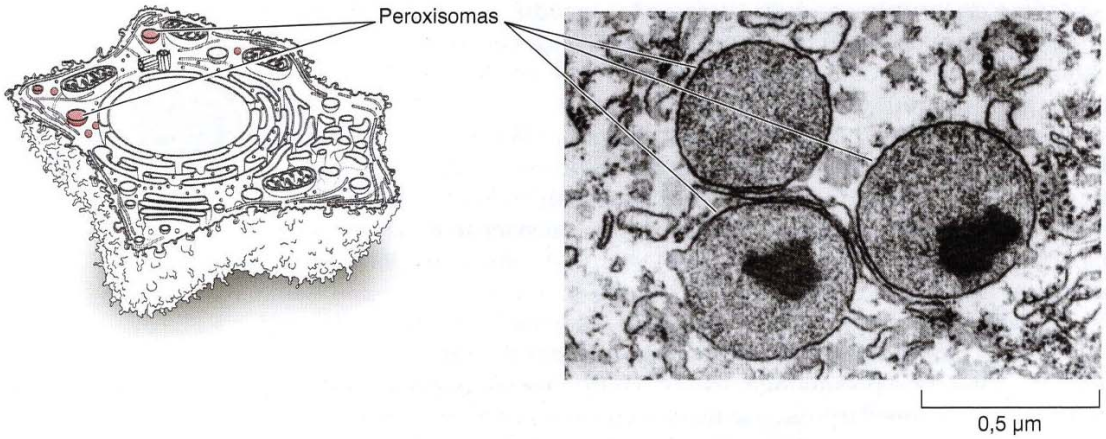


FIGURA 12.20 Microfotografía electrónica de los peroxisomas. Se muestran tres peroxisomas de hígado de rata. Dos contienen regiones densas, que son formaciones paracristalinas de la enzima urato oxidasa.

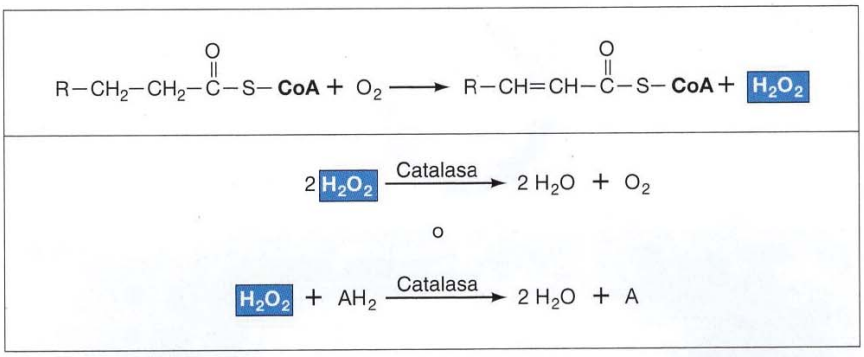


FIGURA 12.21 Oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas. La oxidación de un ácido graso se acompaña de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir del oxígeno. El peróxido de hidrógeno se descompone por la acción de una catalasa, bien mediante la formación de agua u oxidando otro compuesto orgánico (mostrado como AH_2).

y los cloroplastos, los peroxisomas pueden replicarse mediante división. Sin embargo, a diferencia de estos orgánulos, los peroxisomas también pueden ser rápidamente regenerados aunque se hayan perdido por completo por parte de la célula. Mientras que muchas proteínas mitocondriales y plastídicas se parecen a las de los procariotas, reflejando su origen endosimbiótico, las proteínas de peroxisomas se parecen a las proteínas eucariotas típicas.

Funciones de los peroxisomas

Los peroxisomas humanos contienen más de 50 enzimas diferentes que desempeñan cometidos fundamentales en varias vías metabólicas, algunas de las cuales son específicas de tejidos particulares. Originalmente, los peroxisomas se definieron como orgánulos que llevaban a cabo reacciones oxidativas produciendo peróxido de hidrógeno. Debido a que el peróxido de hidrógeno es nocivo para la célula, los peroxisomas también contienen la enzima **catalasa**, que descompone el peróxido de hidrógeno bien convirtiéndolo en agua o utilizándolo para oxidar otro compuesto orgánico. Diversos sustratos se degradan mediante estas reacciones oxidativas en los peroxisomas, incluyendo el ácido úrico, aminoácidos y ácidos grasos. La oxidación de los ácidos grasos (**Fig. 12.21**) es un ejemplo especialmente importante ya que proporciona una fuente fundamental de energía metabólica. En las células animales los ácidos grasos se oxidan tanto en los peroxisomas como en las mitocondrias, pero en las levaduras y en las plantas la oxidación de los ácidos grasos está restringida a los peroxisomas. Los peroxisomas de mamíferos participan especialmente en el catabolismo de los ácidos grasos ramificados y de cadena muy larga.

Además de proporcionar un compartimento para las reacciones de oxidación, los peroxisomas intervienen en la biosíntesis de lípidos. En las células animales, el colesterol y el dolicol se sintetizan en los peroxisomas y en el RE. En el hígado, los peroxisomas también intervienen en la síntesis de los ácidos biliares, que derivan del colesterol. Además, los peroxisomas contienen enzimas necesarias para la síntesis de los **plasmalógenos** —una familia de fosfolípidos en los que una de las cadenas hidrocarbonadas está unida al glicerol mediante un enlace éter en lugar de por un enlace éster (**Fig. 12.22**)—. Los plasmalógenos son componentes importantes de la membrana en algunos tejidos, particularmente en el corazón y en el cerebro, aunque están ausentes en otros.

En las plantas los peroxisomas desempeñan dos papeles especialmente importantes. En primer lugar, los peroxisomas en las semillas son los res-

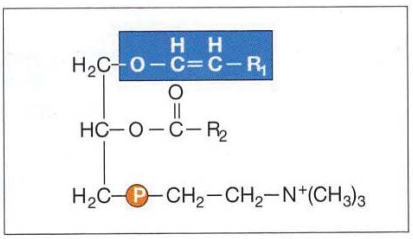


FIGURA 12.22 Estructura de un plasmalógeno. El plasmalógeno mostrado es semejante a la fosfatidilcolina. Sin embargo, una de las cadenas de ácido graso está unida al glicerol mediante un enlace éter, en lugar de por un enlace éster.

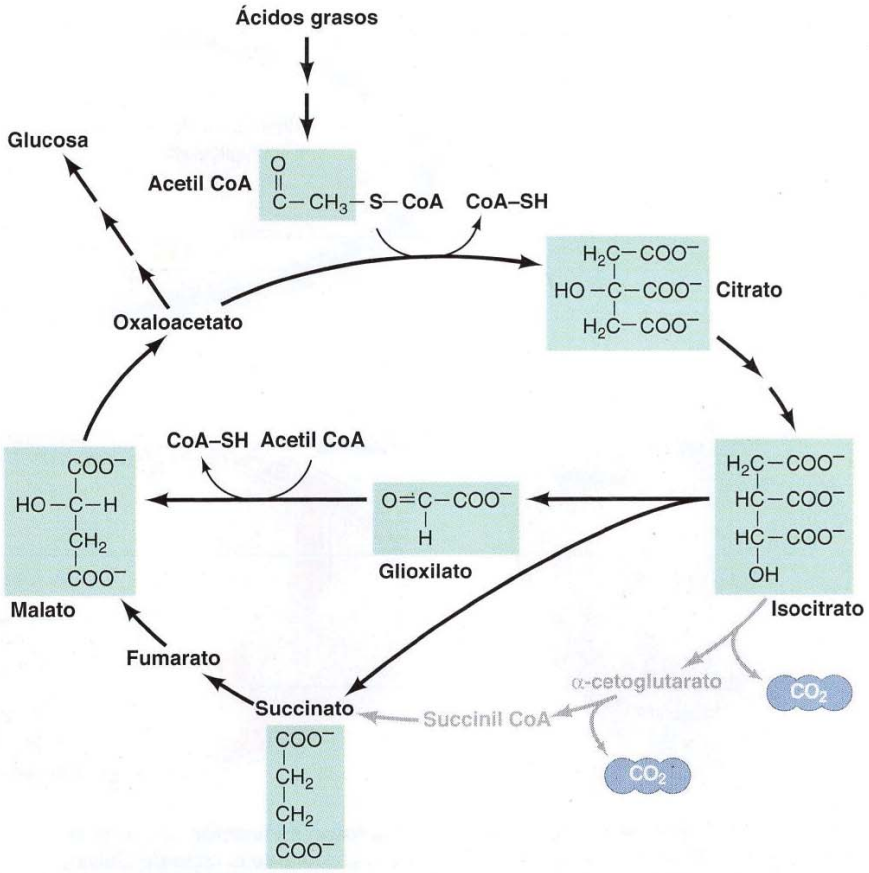


FIGURA 12.23 Ciclo del glioxilato. Las plantas son capaces de sintetizar carbohidratos a partir de los ácidos grasos a través del ciclo del glioxilato, que es una variante del ciclo del ácido cítrico (véase Fig. 3.4). Como sucede en el ciclo del ácido cítrico, el acetil CoA se combina con oxaloacetato para formar citrato, que es convertido en isocitrato. Sin embargo, en lugar de ser degradado a CO_2 y α-cetoglutarato *(flechas grises)*, el isocitrato pasa a succinato y glioxilato. El glioxilato reacciona a continuación con otra molécula de acetil CoA para generar malato, que es convertido en oxaloacetato y utilizado para la síntesis de glucosa.

ponsables de convertir los ácidos grasos almacenados en carbohidratos, aspecto que es crítico para proporcionar energía y materia prima para el desarrollo de la planta. Esto ocurre a través de una serie de reacciones denominadas el **ciclo del glioxilato**, que es una variante del ciclo del ácido cítrico (**Fig. 12.23**). Los peroxisomas en los que tiene lugar este ciclo a veces se denominan **glioxisomas**. En segundo lugar, los peroxisomas de las hojas están implicados en la **fotorrespiración**, que sirve para metabolizar un producto derivado de la fotosíntesis (**Fig. 12.24**). En la fotosíntesis, el CO_2 es convertido en carbohidratos a través de una serie de reacciones denominadas ciclo de Calvin (véase Fig. 3.15). El primer paso es la adición de CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa-1,5-bifosfato, que da lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato (cada una de ellas con tres carbonos). Sin embargo, la enzima responsable (ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa o rubisco) algunas veces cataliza la adición de O_2 en lugar de CO_2, produciendo una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de fosfoglicolato (dos carbonos) (véase Fig. 12.24).Cuando esto ocurre, el fosfoglicolato no es un metabolito útil. Primero es convertido en glicolato y después transferido a los peroxisomas, donde se oxida y se convierte en glicina. La glicina se transfie-

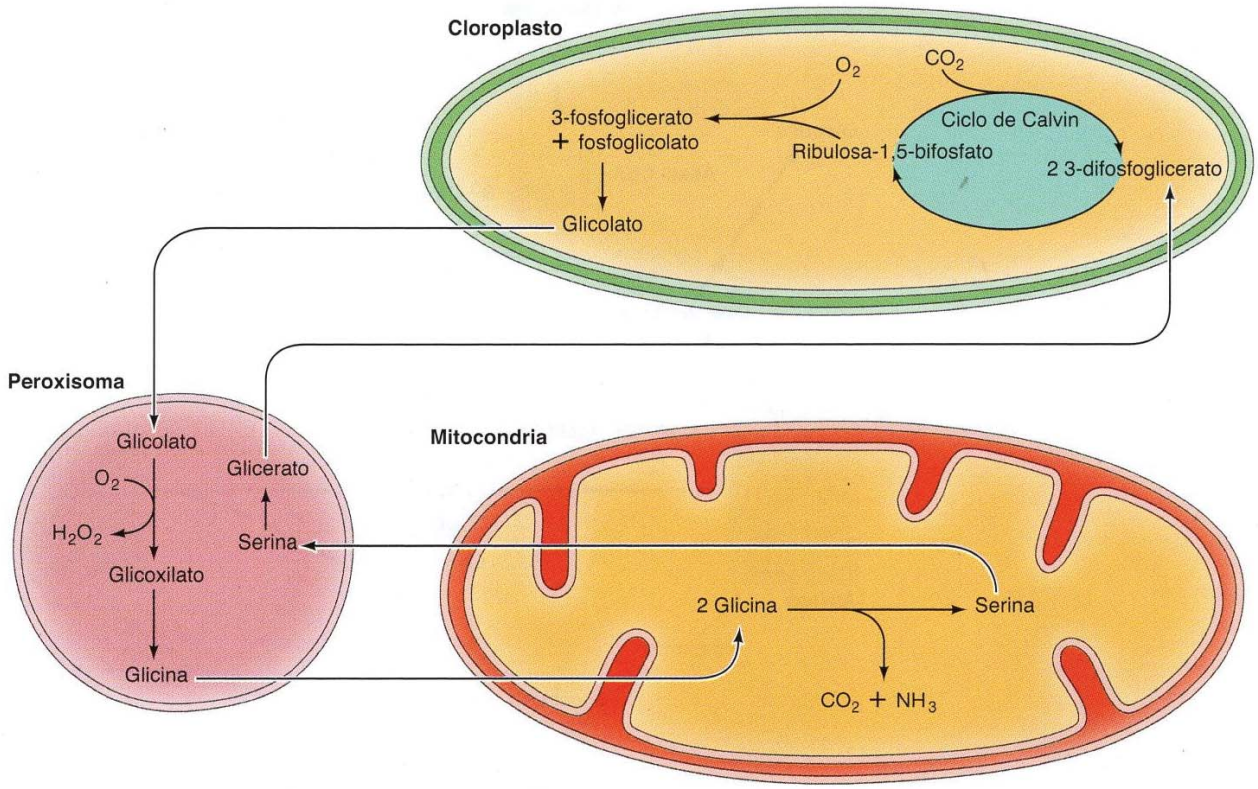


FIGURA 12.24 Papel de los peroxisomas en la fotorrespiración. Durante la fotosíntesis, el CO_2 es convertido en carbohidratos mediante el ciclo de Calvin, que se inicia con la adición de CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5-bifosfato. Sin embargo, algunas veces, la enzima implicada cataliza la adición de O_2 en lugar de CO_2, dando lugar al compuesto de dos carbonos fosfoglicolato. El fosfoglicolato es convertido en glicolato, que posteriormente es transferido a los peroxisomas, donde se oxida y se convierte en glicina. La glicina a continuación es transferida a la mitocondria y se convierte en serina. La serina es devuelta a los peroxisomas y convertida en glicerato, que es devuelto a los cloroplastos.

re a las mitocondrias, donde dos moléculas de glicina son convertidas en una molécula de serina, con la pérdida de CO_2 y NH_3. La serina es devuelta a continuación a los peroxisomas, donde es convertida en glicerato. Finalmente, el glicerato retorna a los cloroplastos, donde se reintroduce en el ciclo de Calvin. Desde entonces, la utilización ocasional del O_2 en lugar del CO_2 es una característica inherente de la rubisco, por lo que la fotorrespiración suele acompañar a la fotosíntesis. Por tanto, los peroxisomas desempeñan un papel importante al permitir que la mayor parte del carbono presente en el glicolato sea recuperado y utilizado.

Formación del peroxisoma

En el ensamblaje de peroxisomas actúa como mediadora la intersección de proteínas sintetizadas en ribosomas citosólicos libres y proteínas transportadas a los peroxisomas desde el RE. Las proteínas peroxisómicas internas son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres y después importadas a los peroxisomas, pero muchas proteínas transmembrana peroxisómicas son transportadas a los peroxisomas desde el RE. Estas proteínas transmembrana incluyen proteínas que intervienen en el transporte de metabolitos, así como otras denominadas **peroxinas** o **proteínas Pex**, que intervienen en el

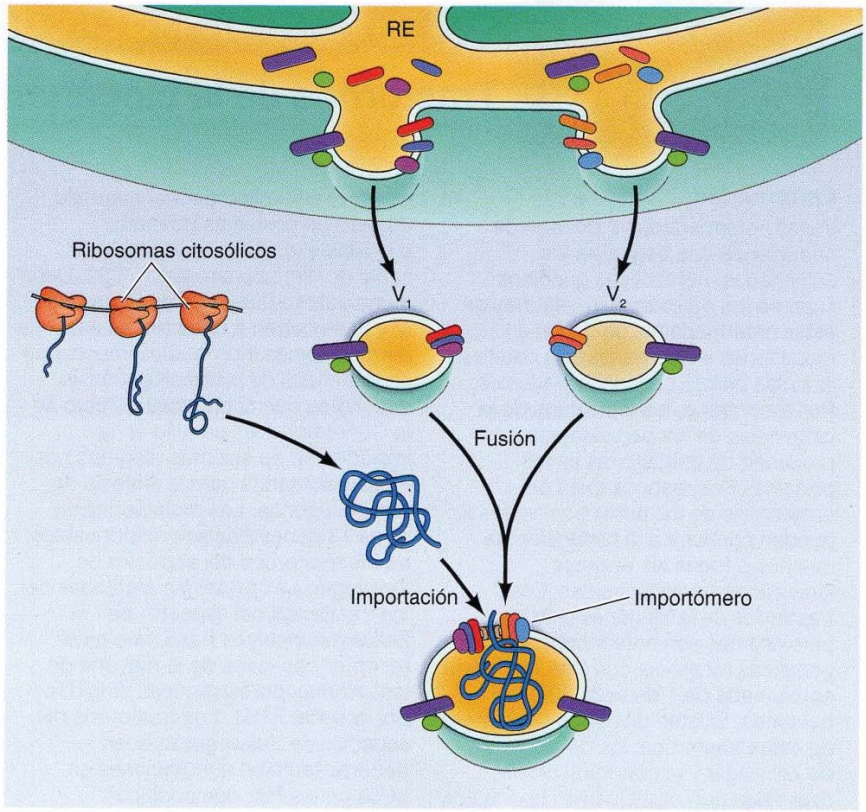
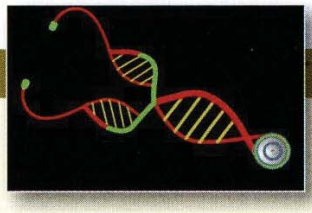


FIGURA 12.25 Ensamblaje de peroxisomas. Proteínas transmembrana peroxisómicas derivadas del RE. Dos tipos diferentes de vesículas (designados como V_1 y V_2) que transportan distintas proteínas transmembrana se fusionan para formar un peroxisoma funcional. La combinación de estas diferentes proteínas forma la maquinaria (importómero) a través de la cual pueden importarse las proteínas de peroxisoma interno sintetizadas en ribosomas citosólicos.

peroxisoma. Se han identificado mutaciones en peroxinas en las levaduras y en asociación con diversas enfermedades en seres humanos (**trastornos de la biogénesis de los peroxisomas**) que proceden de un ensamblaje peroxisómico defectuoso. Como se explica más adelante, algunas de las peroxinas forman canales de membrana a través de los cuales se importan las proteínas (de matriz) internas de los peroxisomas.

La mayor parte de las proteínas transmembrana peroxisómicas experimentan primero una translocación en el RE y se insertan en la membrana del RE tal como se explica en el Capítulo 11. Estas proteínas forman después vesículas por gemación a partir de una región especializada del RE denominada RE peroxisómico (**Fig. 12.25**). A diferencia de otras vesículas formadas por gemación desde el RE, las que proceden de la gemación del RE peroxisómico no tienen una cubierta COPII y su formación puede ser impulsada por las peroxinas. En lugar de dirigirse al aparato de Golgi, las vesículas del RE peroxisómico se fusionan para formar peroxisomas a los que pueden importarse las proteínas de matriz. La formación de un peroxisoma funcional requiere la fusión de dos tipos diferentes de vesículas que contienen distintas clases de peroxinas, ambos necesarios para la importación de proteínas de matriz.

Las proteínas de matriz peroxisómicas son trasladadas a ribosomas citosólicos libres y después se importan en peroxisomas como polipéptidos completos y plegados. Se dirigen a los peroxisomas por dos vías, que se conservan desde las levaduras hasta los seres humanos. La mayor parte de las proteínas se dirigen a los peroxisomas por la sencilla secuencia de aminoácidos Ser-Lis-Leu en su extremo carboxilo (señal de direccionamiento de peroxisomas 1, o PTS1). Un pequeño número de proteínas se dirigen por medio de una secuencia de nueve aminoácidos cerca de su extremo amino (señal de direccionamiento de peroxisomas 2, o PTS2). Las señales PTS1 y



MEDICINA MOLECULAR

Trastornos de la biogénesis de los peroxisomas

Enfermedad

Varias enfermedades proceden de mutaciones que degradan las actividades metabólicas que tienen lugar en los peroxisomas. Algunas de estas enfermedades se deben a mutaciones en los genes que codifican enzimas peroxisómicas individuales. Por el contrario, los trastornos de la biogénesis de los peroxisomas proceden de mutaciones en las proteínas Pex responsables del ensamblaje de los peroxisomas y, así, pueden conducir a la disfunción de muchas o todas las enzimas localizadas en peroxisomas. Los trastornos de la biogénesis de los peroxisomas son enfermedades genéticas recesivas con una incidencia aproximada de 1 de cada 50.000 personas. Existen dos tipos diferentes de estos trastornos: los del espectro de Zellweger y la condrodisplasia rizomélica punteada (CDRP) tipo 1. Los trastornos del espectro de Zellweger presentan gravedad diversa, desde el síndrome de Zellweger (el más grave) a formas leves o moderadas, como la leucodistrofia neonatal (LDNN) y la enfermedad de Refsum infantil (ERI), respectivamente. Los pacientes con síndrome de Zellweger suelen morir en la primera infancia, mientras que los afectados por LDNN sobreviven a veces hasta la adolescencia y los afectados por ERI alcanzan la edad adulta. Entre los síntomas figuran retraso en el desarrollo, anomalías características de los rasgos faciales, pérdida de audición y visión y disfunción hepática. La CDRP tipo 1 es diferente del síndrome de Zellweger y se caracteriza por extremidades cortas, baja estatura, cataratas y retraso psicomotor. Algunos pacientes con CDRP mueren en la primera infancia y otros viven hasta la edad adulta.

Bases moleculares y celulares

Se ha descubierto que las mutaciones en 14 genes *Pex* diferentes, que son necesarios para el ensamblaje de los peroxisomas están en el origen de los trastornos de la biogénesis de los peroxisomas (véase Tabla). La CDRP tipo 1 se produce en concreto por mutaciones de *Pex*7, que codifica el receptor citosólico para el pequeño número de proteínas de matriz dirigidas a los peroxisomas por la señal de direccionamiento PTS2. Debe mencionarse que otros tipos de CDRP (2 y 3) se deben a defectos en enzimas peroxisómicas individuales implicadas en la síntesis de plasmalógenos, lo que indica que el principal defecto en la CDRP tipo 1 es un fallo en la importación de enzimas dirigidas por PTS2 necesarias para la síntesis de plasmalógenos. Las mutaciones en otros 13 genes *Pex* son responsables de los trastornos del espectro de Zellweger. Las proteínas afectadas por los trastornos del espectro de Zellweger incluyen Pex5, que es el receptor citosólico de la mayoría de las enzimas peroxisómicas dirigidas por la señal PTS1. Los trastornos del espectro de Zellweger pueden deberse también a mutaciones en otros genes *Pex* que codifican proteínas que sirven para fijar Pex5 en la membrana peroxisómica o que actúan en el reciclaje de Pex5 después de que se haya entregado su carga a los peroxisomas (véase Fig. 12.26). Además, los trastornos del espectro de Zellweger pueden originarse por defectos en varias proteínas Pex implicadas en la importación de proteínas de membrana peroxisómicas (véase Fig. 12.27). Finalmente, las mutaciones en un gen Pex que codifica una proteína necesaria para la división de los peroxisomas pueden conducir a trastornos del espectro de Zellweger. Diferentes mutaciones en estos genes *Pex* pueden provocar el grave síndrome de Zellweger y las presentaciones menos graves de LDNN o ERI. La gravedad del trastorno no está relacionada directamente con el gen mutado, sino con la naturaleza de la mutación y el efecto correspondiente en el ensamblaje de los peroxisomas. Las mutaciones que destruyen por completo la función de las proteínas Pex producen una enfermedad grave, mientras que las formas menos graves proceden de sustituciones de aminoácidos que reducen, pero no eliminan, la función de la proteína Pex mutada.

Prevención y tratamiento

En la actualidad no hay cura ni tratamiento estándar para los trastornos de la biogénesis de los peroxisomas. A los pacientes se les ofrece tratamiento de soporte dirigido a aliviar los síntomas de la enfermedad.

Referencias

Waterham, H. R. and M. S. Ebberink. 2012. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys.* Acta 1822: 1430–1441.

Mutaciones de peroxina en los trastornos de la biogénesis de los peroxisomas

Gen *Pex*	Función proteínica	Enfermedad
*Pex*7	Receptor citosólico para proteínas de matriz dirigidas por PTS2	CDRP tipo 1
*Pex*5	Receptor citosólico para proteínas de matriz dirigidas por PTS1	Trastorno del espectro de Zellweger
*Pex*1, 2, 6, 10, 12, 26	Reciclaje de Pex5	
*Pex*13, 14	Anclaje de Pex5	
*Pex*19	Receptor citosólico para proteína de membrana del peroxisoma	
*Pex*3, 16	Anclaje de Pex19 e inserción de proteínas de membrana	
*Pex*11β	División de peroxisomas	

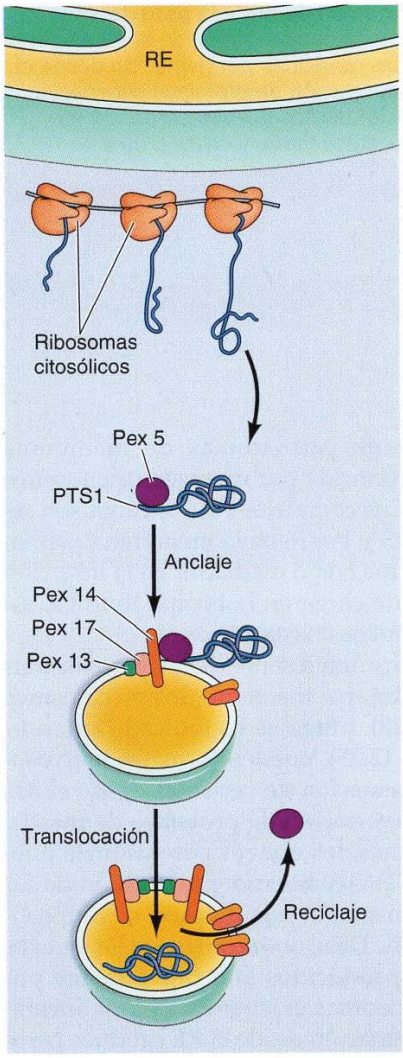


FIGURA 12.26 Importación de proteínas de matriz peroxisómicas. Las proteínas de matriz peroxisómicas que contienen la señal de direccionamiento PTS1 son reconocidas por el receptor citosólico Pex5. El complejo Pex5/carga se une a continuación a un complejo de anclaje (Pex13, Pex14 y Pex17) en la membrana del peroxisoma. Pex5 y Pex14 forman un poro en la membrana y la proteína de carga es translocada en el peroxisoma. Seguidamente, Pex5 se recicla en el citosol.

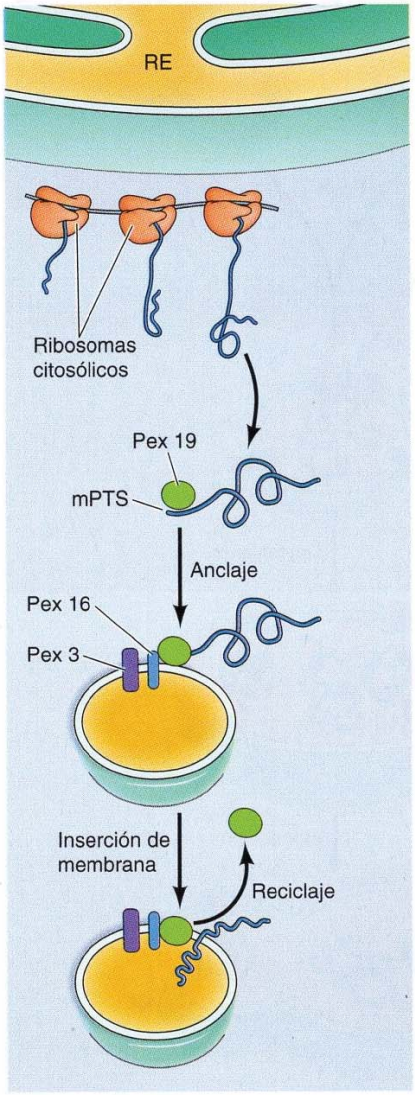


FIGURA 12.27 Importación de proteínas de membrana peroxisómicas desde el citosol. Las proteínas de membrana del peroxisoma sintetizadas en los ribosomas citosólicos tienen una señal de direccionamiento (mPTS) que es reconocida por el receptor citosólico Pex19. Los complejos Pex19/carga se unen entonces a Pex3 y Pex16 en la membrana del peroxisoma y Pex19 actúa como mediador en la inserción de su carga y el ensamblaje de complejos de proteínas en la bicapa lipídica. Entonces, Pex19 se recicla en el citosol.

PTS2 son reconocidas por distintos receptores citosólicos, las peroxinas Pex5 y Pex7, respectivamente. El proceso de translocación en peroxisomas, en el que interviene como mediador el paso de grandes proteínas y complejos proteínicos a través de la membrana, ha sido estudiado en detalle para las proteínas con la señal de direccionamiento PTS1 (**Fig. 12.26**). El complejo Pex5/carga se une primero a un complejo de anclaje, que consiste en otras tres peroxinas (Pex13, Pex14 y Pex17) en la membrana peroxisómica. Después, Pex5 y Pex14 forman un poro en la membrana a través del cual se transloca la carga en el peroxisoma. A continuación, Pex5 se recicla por la acción de otras proteínas Pex en la membrana y se utiliza para tandas posteriores de importación de carga.

No sólo las proteínas de matriz internas, sino también algunas proteínas de membrana peroxisómicas, son sintetizadas en ribosomas citosólicos y no transportadas desde el RE (**Fig. 12.27**). Estas proteínas tienen una señal de

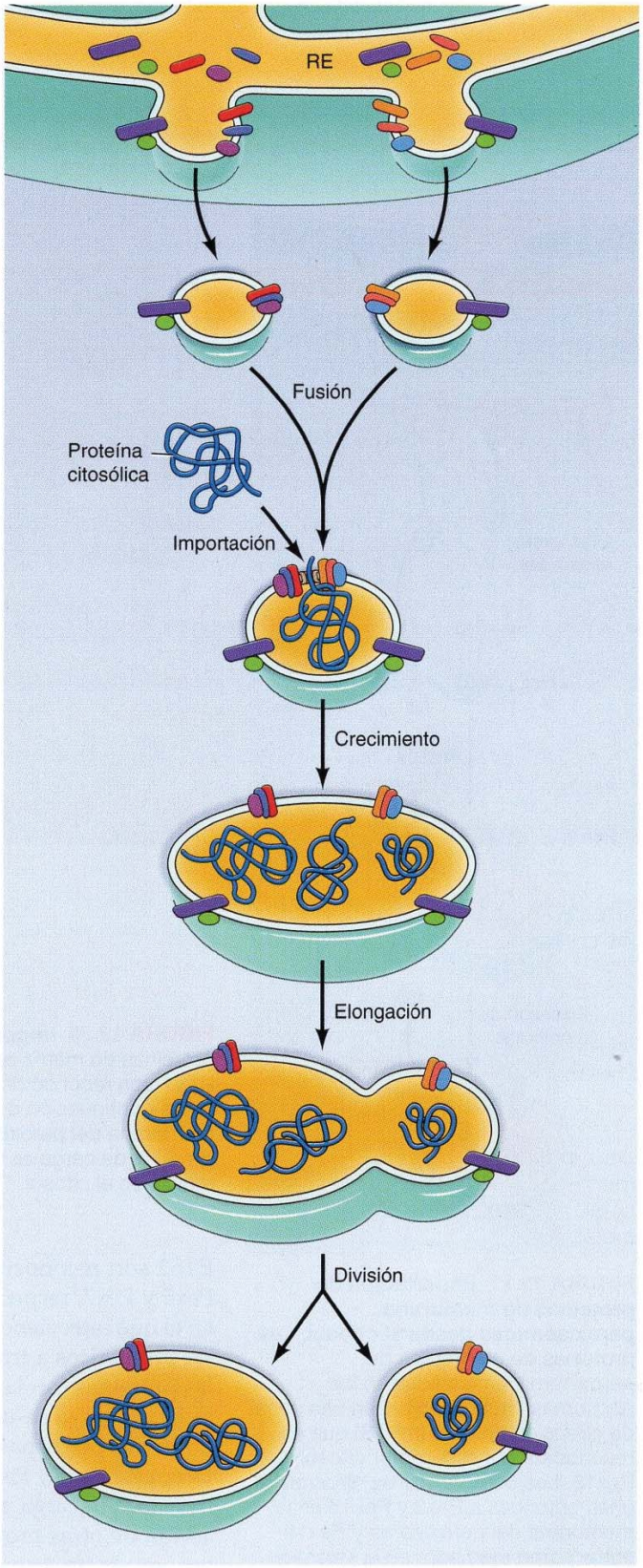


FIGURA 12.28 Formación de nuevos peroxisomas. Los nuevos peroxisomas pueden formarse *de novo* por la fusión de las vesículas obtenidas por gemación desde el RE seguido por la importación de proteínas citosólicas (véase Fig. 12.25). Además, los nuevos peroxisomas pueden formarse por crecimiento y división de los antiguos.

direccionamiento de peroxisomas de membrana (mPTS) que es reconocida por un receptor citosólico diferente, Pex19. Los complejos Pex19/carga son reconocidos por Pex3 y Pex16 en la membrana peroxisómica y Pex19 actúa como mediador en la inserción de sus proteínas de carga en la bicapa lipídica, así como en su ensamblaje en complejos.

Una característica interesante de los peroxisomas es que pueden formarse mediante dos mecanismos distintos (**Fig. 12.28**). Como se ha indicado anteriormente (véase Fig. 12.25), pueden formarse peroxisomas nuevos por gemación de vesículas desde el RE, seguido por la importación de proteínas de matriz. No obstante, además, los nuevos peroxisomas pueden formarse por el crecimiento y la división de los antiguos, de forma similar a la división de mitocondrias y cloroplastos. Debe observarse que los nuevos peroxisomas son producidos más rápidamente por división de peroxisomas existentes, pero la formación *de novo* por gemación desde el RE produce peroxisomas con contenidos totalmente nuevos. Tanto la formación de nuevos peroxisomas *de novo* como el crecimiento y la división de los existentes contribuyen, según se piensa, al mantenimiento de la población de peroxisomas de la célula en respuesta a las necesidades metabólicas.

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Mitocondrias

Organización y función de las mitocondrias: Las mitocondrias, que desempeñan un papel crítico en la generación de la energía metabólica, están rodeadas por un sistema de doble membrana. La matriz contiene las enzimas del ciclo del ácido cítrico; la membrana interna contiene complejos proteínicos implicados en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. A diferencia de la membrana interna, la membrana externa es completamente permeable a las moléculas pequeñas.

Ver Vídeos 12.1 y 12.2

mitocondrias, crestas, matriz, porina

Sistema genético de las mitocondrias: Las mitocondrias contienen su propio genoma, que codifica para el ARNr, ARNt y para algunas de las proteínas que intervienen en la fosforilación oxidativa.

endosimbiosis

Internalización de proteínas y formación de las mitocondrias: La mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear. Estas proteínas son traducidas en ribosomas libres y entran en las mitocondrias como cadenas polipeptídicas completas. Las presecuencias cargadas positivamente dirigen las proteínas para que sean importadas a la matriz mitocondrial.

presecuencia, complejo Tom, complejo Tim, peptidasa procesadora de la matriz (MPP)

Lípidos mitocondriales: La mayor parte de los fosfolípidos son transportados a las mitocondrias desde el retículo endoplásmico por proteínas de transferencia de fosfolípidos. Las mitocondrias sintetizan también la cardiolipina, un fosfolípido infrecuente que contiene cuatro ácidos grasos.

proteína de transferencia de fosfolípidos, cardiolipina

Transporte de metabolitos a través de la membrana interna: Muchas proteínas de la membrana interna transportan moléculas pequeñas a, y desde las mitocondrias. La energía potencial almacenada en el gradiente de protones dirige el transporte de ATP, ADP y otros metabolitos al interior y exterior de las mitocondrias.

Cloroplastos y otros plástidos

Estructura y función de los cloroplastos: Los cloroplastos son orgánulos grandes responsables de la fotosíntesis y de otras actividades metabólicas. Como sucede con las mitocondrias, los cloroplastos están rodeados por una envuelta de doble membrana. Además, los cloroplastos tienen una membrana tilacoidal interna, que es el lugar del transporte de electrones y de la generación quimiosmótica de ATP.

Ver Vídeo 12.3

cloroplasto, membrana del tilacoide, estroma

Genoma del cloroplasto: El genoma del cloroplasto contiene aproximadamente 150 genes, incluyendo genes que codifican ARNr, ARNt, proteínas ribosómicas, ARN polimerasa y proteínas que intervienen en la fotosíntesis y en el metabolismo.

Internalización y distribución de las proteínas del cloroplasto: La mayoría de las proteínas del cloroplasto son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol, y son marcadas para que se importen a los cloroplastos mediante péptidos de tránsito amino terminales. Las proteínas incorporadas en la luz del tilacoide, primero se importan al estroma del cloroplasto y después se marcan con una segunda secuencia señal hidrofóbica para su transporte a través de la membrana del tilacoide.

péptido de tránsito, complejo Toc, complejo Tic, peptidasa procesadora estromal (SPP)

Otros plástidos: El cloroplasto es sólo uno de los miembros de una familia de orgánulos relacionados, que contienen el mismo genoma. Otros plástidos sirven para almacenar fuentes de energía, como almidón y lípidos, e intervienen en otros aspectos del metabolismo de la planta.

Ver Animación 12.1

plástido, cromoplasto, leucoplasto, amiloplasto, elaioplasto, proplástido, etioplasto

RESUMEN

Peroxisomas

Funciones de los peroxisomas: Los peroxisomas son orgánulos pequeños, rodeados por una única membrana, que contienen enzimas que intervienen en diversas reacciones metabólicas, entre las que se incluyen la oxidación de los ácidos grasos, biosíntesis de lípidos, el ciclo del glioxilato y la fotorrespiración.

Ensamblaje de los peroxisomas: La mayor parte de las proteínas transmembrana son transportadas a los peroxisomas desde el RE, mientras que las proteínas peroxisómicas internas son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol e importadas en los peroxisomas como cadenas polipeptídicas completas y plegadas. Las peroxinas pueden formarse *de novo* a partir del RE y por crecimiento y división de peroxisomas existentes.

PALABRAS CLAVE

peroxisoma, catalasa, plasmalógeno, ciclo del glioxilato, glioxisoma, fotorrespiración

peroxina, proteína *Pex*, trastorno de la biogénesis de los peroxisomas

Preguntas

1. ¿Qué dos propiedades de la membrana mitocondrial interna le permiten tener una actividad metabólica especialmente elevada?
2. De acuerdo con reglas *wobble* estándar, la síntesis proteica citosólica puede tener lugar con un mínimo de 30 ARNt diferentes. ¿Cómo consiguen las mitocondrias humanas traducir ARNm en proteínas con sólo 22 especies de ARNt?
3. ¿Qué papeles juegan las chaperonas moleculares en la internalización de proteínas en la mitocondria?
4. ¿De dónde procede la energía necesaria para el transporte?
5. ¿Cuál es la relación entre la membrana del tilacoide de los cloroplastos y la membrana interna de las mitocondrias?
6. ¿Por qué los péptidos de tránsito de las proteínas de los cloroplastos, a diferencia de las presecuencias de las proteínas mitocondriales, no están cargados positivamente?
7. Supón que estás estudiando una proteína presente en la luz del tilacoide y que has identificado una secuencia señal que dirige la proteína para translocación a través de la membrana del tilacoide. Si mutas el gen mediante deleción de la secuencia señal, ¿dónde se encontrará la proteína?
8. ¿En qué se diferencian los cloroplastos de los cromoplastos?
9. ¿Cómo se dirigen las proteínas de membrana a los peroxisomas?
10. ¿Qué efecto tendría el ARNsi contra *Pex*5 en el ensamblaje de los peroxisomas?

Bibliografía

Mitocondrias

Andreux, P. A., R. H. Houtkooper and J. Auwerx. 2013. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nature Rev. Drug Discovery* 12: 465–483. [R]

Blackstone, C. and C. R. Chang. 2011. Mitochondria unite to survive. *Nature Cell Biol.* 13: 521–522. [R]

Chacinska, A., C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow and N. Pfanner. 2009. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628–644. [R]

Chen, X. J. and R. A. Butow. 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Rev. Genet.* 6: 815–825. [R]

Dudek, J., P. Rehling and M. van der Laan. 2013. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 274–285. [R]

Farrar, G. J., N. Chadderton, P. F. Kenna and S. Millington-Ward. 2013. Mitochondrial disorders: aetiologies, model systems, and candidate therapies. *Trends Genet.* 29: 488–497.

Friedman, J. R. and J. Nunnari. 2014. Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335–343. [R]

Lev, S. 2010. Non-vesicular lipid transport by lipid-transport proteins and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 739–750. [R]

Mishra, P. and D. C. Chan. 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 634–646. [R]

Neupert, W. and J. M. Herrmann. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 723–749. [R]

Park, C. B. and N.G. Larsson. 2011. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* 193: 809–818. [R]

Schmidt, O., N. Pfanner and C. Meisinger. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 655–667. [R]

Schulz, C., A. Schendzielorz and P. Rehling. 2015. Unlocking the presequence import pathway. *Trends Cell Biol.* 25: 265–275. [R]

Tatsuta, T., M. Scharwey and T. Langer. 2014. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.* 24: 44–52. [R]

Cloroplastos y otros plástidos

Albiniak, A. M., J. Baglieri and C. Robinson. 2012. Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane. *J. Exptl. Botany* 63: 1689–1698. [R]

Andres, C., B. Agne and F. Kessler. 2010. The TOC complex: preprotein gateway to the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* 1803: 715–723. [R]

Flores-Pérez, U. and P. Jarvis. 2013. Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 332–340. [R]

Green, B. R. 2011. Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J.* 66: 34–44. [R]

Inoue, K. 2011. Emerging roles of the chloroplast outer envelope membrane. *Trends Plant Sci.* 16: 550–557. [R]

Jarvis, P. and E. López-Juez. 2013. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 787–802. [R]

Kovacs-Bogdan, E., J. Soll and B. Bolter. 2010. Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1803: 740–747. [R]

Lee, D. W., C. Jung and I. Hwang. 2013. Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 245–252. [R]

Li, H. M. and C.-C. Chiu. 2010. Protein transport into chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Biol.* 61: 157–180. [R]

Shi, L.-X. and S. M. Theg. 2013. The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 314–331. [R]

Wang, P. and R. E. Dalbey. 2011. Inserting membrane proteins: The YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1808: 866–875. [R]

Peroxisomas

Agrawal, G. and S. Subramani. 2013. Emerging role of the endoplasmic reticulum in peroxisome biogenesis. *Front. Physiol.* 4: 286. [R]

Hasan, S., H. W. Platta and R. Erdmann. 2013. Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Front. Physiol.* 4: 261. [R]

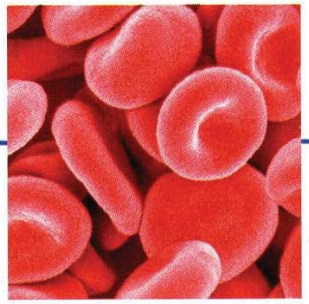
Hoepfner, D., D. Schildknegt, L. Braakman, P. Philippsen and H. F. Tabak. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122: 85–95. [P]

Smith, J. J. and J. D. Aitchison. 2013. Peroxisomes take shape. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 803–817. [R]

Tabak, H. F., I. Braakman and A. van der Zand. 2013. Peroxisome formation and maintenance are dependent on the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 82: 723–744. [R]

Wanders, R. J. A. 2014. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* 98: 36–44. [R]

Waterham, H. R. and M. S. Ebberink. 2012. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1822: 1430–1441. [R]



Capítulo 13

Citoesqueleto y movimiento celular

Estructura y organización de los filamentos de actina 479

Motores de miosina 493

Microtúbulos 501

Motores microtubulares y movimientos 508

Filamentos intermedios 519

EXPERIMENTO CLAVE:
Aislamiento de la quinesia 509

EXPERIMENTO CLAVE:
La expresión de una queratina mutante causa un desarrollo anómalo de la piel 524

Los orgánulos intracelulares de los que se ha hablado en los capítulos precedentes constituyen un nivel de la estructura subcelular de las células eucariotas. Un nivel de organización más avanzado lo proporciona el citoesqueleto, que consiste en una red de filamentos de proteína que se extienden por el citoplasma. El citoesqueleto proporciona un armazón estructural para la célula, actuando como un andamio que determina la forma celular y la organización general del citoplasma. Además de desempeñar este papel estructural, el citoesqueleto es el responsable de los movimientos de la célula. Estos no solamente incluyen los movimientos de la célula en conjunto, sino también el transporte interno de los orgánulos y de otras estructuras (tales como los cromosomas mitóticos) a través del citoplasma. Es importante señalar que el citoesqueleto es mucho menos rígido y estable de lo que su nombre indica. Más bien es una estructura dinámica que se reorganiza continuamente según las células se mueven y cambian su forma, por ejemplo durante la división celular.

El citoesqueleto está constituido por tres tipos principales de filamentos de proteína: filamentos de actina, filamentos microtúbulos e intermedios, que se mantienen juntos y unidos a los orgánulos intracelulares y a la membrana plasmática mediante varias proteínas accesorias. Este capítulo trata sobre la estructura y la organización de cada uno de los tres componentes principales del citoesqueleto, así como del papel de los filamentos de actina y microtúbulos que desempeñan en la motilidad celular, en el transporte de orgánulos, en la división celular y en otros tipos de movimientos celulares.

Estructura y organización de los filamentos de actina

La proteína citoesquelética más abundante de la mayoría de las células es la **actina**, que polimeriza para formar filamentos de actina —fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud (**Fig. 13.1**)—. Dentro de la célula, los filamentos de actina (también llamados **microfilamentos**) se organizan en estructuras de un orden superior, formando haces o redes tridimensionales con las propiedades de un gel semisólido. El ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, sus uniones cruzadas constituyendo haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares (tales como la membrana plasmática) se regulan mediante diversas **proteínas de unión a la actina**, que son componentes críticos del citoesqueleto de actina (**Tabla 13.1**). Los filamentos de actina abundan sobre todo debajo de la membrana plasmática, donde forman una red que proporciona un soporte mecánico, determina la forma celular y permite el movimiento de la superficie celular, lo que permite a las células migrar, engullir partículas y dividirse.

Ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina

La actina se aisló por primera vez en 1942 a partir de células musculares, en las que constituye aproximadamente el 20% de la proteína total de la célula. Aunque en un principio se pensó que la actina estaba implicada únicamente en la contracción muscular, ahora se sabe que es una proteína muy abundante (en general entre un 5% y un 10% de la proteína total) en toda clase de células eucariotas. Las levaduras sólo tienen un gen para la actina, pero los eucariotas superiores tienen varios tipos distintos de actina que se encuentran codificados por distintos miembros de la familia de los genes de la actina. Los mamíferos, por ejemplo, tienen al menos seis genes de actina diferentes: cuatro se expresan en distintos tipos de músculo (esquelético, cardíaco y músculo liso) y dos se expresan en células no musculares. Sin embargo, todas las actinas tienen una secuencia de aminoácidos similar y se han mantenido muy conservadas a lo largo de la evolución de los eucariotas. Por ejemplo, la actina de la levadura tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en un 90% a la de las actinas de las células de los mamíferos. Las proteínas relacionadas con la actina desempeñan también cometidos importantes en las bacterias, entre ellos la participación en la división celular y la determinación de la forma de la célula.

La estructura tridimensional tanto de las moléculas individuales como de los filamentos de actina fueron determinadas en 1990 por Kenneth Holmes, Wolfgang Kabsch y sus colaboradores. Las moléculas individuales de actina son proteínas globulares de 375 aminoácidos (43 kDa). Cada monómero (**actina globular G**) tiene sitios de unión que median la interacción cabeza con cola con otros dos monómeros de actina, de tal manera que los monómeros de actina polimerizan para formar filamentos (**actina filamentosa F**) (**Fig. 13.2**). En los filamentos cada monómero se encuentra girado 166°, por lo que los filamentos tienen la apariencia de una hélice de doble cadena. Debido a que todos los monómeros de actina están orientados en la misma dirección, los filamentos de actina presentan una polaridad diferenciada y sus extremos (denominados extremos protuberantes [o más] y extremos puntiagudos [o menos]) se distinguen entre sí. Esta polaridad de los filamentos de actina es importante tanto para su ensamblaje como para establecer una dirección única en el movimiento de la miosina respecto a la actina, como se tratará más adelante en el capítulo.

El comportamiento de los monómeros y los filamentos de actina está regulado dentro de las células para aprovechar las propiedades intrínsecas de la actina. En condiciones fisiológicas, los monómeros de actina se polimerizan para formar filamentos. El primer paso de la polimerización de la actina (llamado nucleación) es la formación de un pequeño acúmulo compuesto por tres monómeros de actina. A continuación, los filamentos de actina pueden crecer mediante la adición reversible de monómeros en ambos extremos, pero el extremo (+) se alarga de cinco a diez veces más rápido que el extremo (–). Los monómeros de actina se unen al ATP (véase Fig. 13.2), que se hidroliza a ADP tras el ensamblaje del filamento. Aunque el ATP no es necesario para proporcionar energía para la polimerización, los monómeros de actina unidos a ATP se polimerizan más fácilmente que aquellos que tienen ADP unido. Como resultado, se añaden monómeros de actina-ATP más rápidamente a los extremos (+) de los filamentos, y el ATP se hidroliza a ADP tras la polimerización. La unión de la actina-ADP es más débil, y puede disociarse del extremo (–). Esto da lugar al fenómeno conocido como **intercambio**, por el que se añade actina-ATP al extremo (+) al mismo tiempo que se disocia actina-ADP del extremo (–) del filamento (**Fig. 13.3**). El intercambio ilustra el comportamiento dinámico de los filamentos de actina que, como describimos a continuación, es esencial en la regulación de la estructura y función de los filamentos de actina en la célula.

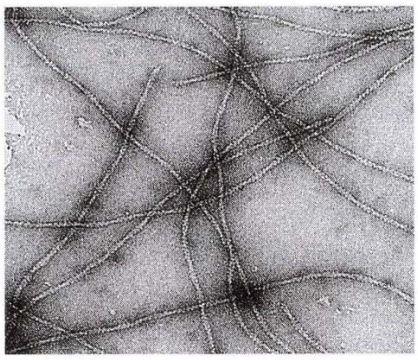


FIGURA 13.1 Filamentos de actina. Micrografía electrónica de filamentos de actina. (Cortesía de Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center.)

ANIMACIÓN 13.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a13.1

Ensamblaje de un filamento de actina. Los monómeros de actina polimerizan para formar filamentos de actina, un proceso que es reversible y está regulado en el interior celular por las proteínas de unión a la actina.

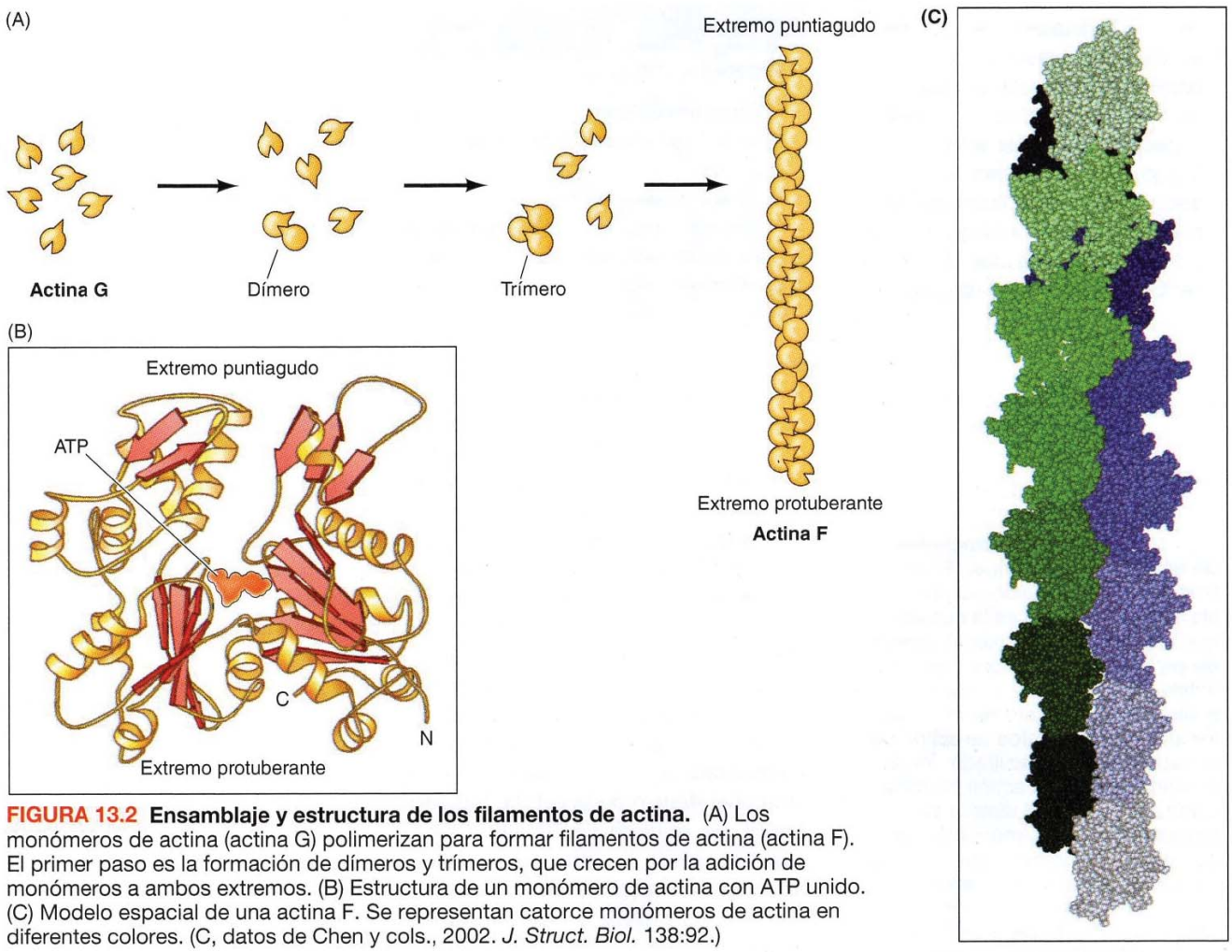


FIGURA 13.2 Ensamblaje y estructura de los filamentos de actina. (A) Los monómeros de actina (actina G) polimerizan para formar filamentos de actina (actina F). El primer paso es la formación de dímeros y trímeros, que crecen por la adición de monómeros a ambos extremos. (B) Estructura de un monómero de actina con ATP unido. (C) Modelo espacial de una actina F. Se representan catorce monómeros de actina en diferentes colores. (C, datos de Chen y cols., 2002. *J. Struct. Biol.* 138:92.)

Es de reseñar que varios fármacos que se utilizan en biología celular actúan uniéndose a la actina y afectando a su polimerización. Por ejemplo, las **citocalasinas** se unen a los extremos protuberantes de los filamentos y bloquean su elongación. Esto provoca cambios en la forma de la célula así como la inhibición de algunos tipos de movimientos celulares (p. ej., la división celular que sigue a la mitosis), lo que indica que la polimerización de la actina es necesaria para estos procesos. Otro fármaco, la **faloidina**, se une

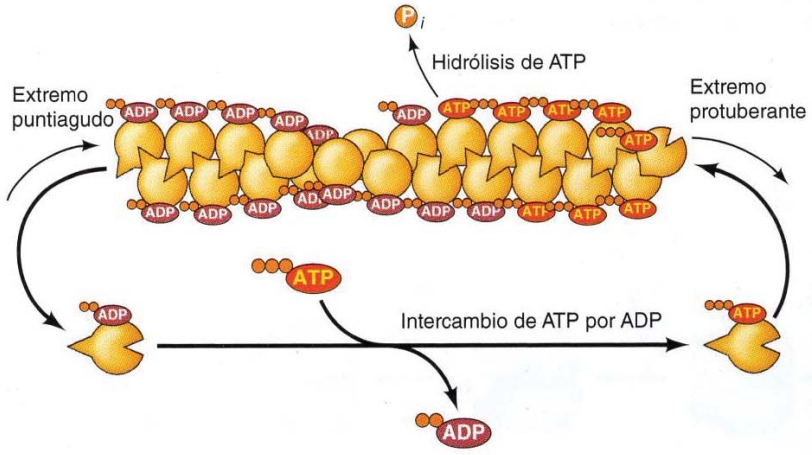


FIGURA 13.3 Intercambio y función del ATP en la polimerización de los filamentos de actina. La actina unida a ATP se asocia con los extremos (+) de crecimiento rápido, y a continuación se produce la hidrólisis de ATP a ADP dentro del filamento. Como la actina-ADP se disocia de los filamentos con más facilidad que la actina-ATP, los monómeros de actina unidos al ADP se disocian del extremo (–) mientras que los monómeros unidos al ATP se añaden al extremo (+).

◆ La faloidina está derivada de la seta venenosa *Amanita phalloides*. Esta seta también produce α-amanitina, un inhibidor específico de la ARN polimerasa II. Las toxinas producidas por esta seta y setas relacionadas atacan principalmente al hígado y la riñón y pueden causar la muerte si no se recibe tratamiento (véase Cap. 8).

TABLA 13.1 Ejemplos de proteínas de unión a actina

Papel en la célula	Proteínas representativas
Unión de monómeros	Profilina, twinfilina
Iniciación y polimerización de filamentos	Arp2/3, formina
Caperuzas	CapZ, tropomodulina
Estabilización de filamentos	Nebulina, tropomiosina
Formación de enlaces cruzados de filamentos	α-actinina, filamina, fimbrina, villina
Unión de filamentos de actina a proteínas	Distrofina, espectrina, talina, vinculina
Escisión de filamentos	Cofilina, gelsolina

fuertemente a los filamentos de actina y evita su disociación en moléculas individuales de actina. La faloidina marcada con un marcador fluorescente se suele utilizar para visualizar los filamentos de actina mediante microscopia de fluorescencia.

Dentro de la célula, el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina está regulado por **proteínas de unión a la actina**. Algunas de las proteínas inician la formación de filamentos de actina y estimulan su crecimiento. Otras estabilizan los filamentos de actina uniéndolos a lo largo de su extensión o cubriendo sus extremos y evitando la disociación de monómeros de actina. Por el contrario, algunas proteínas actúan para desensamblar filamentos de actina cortándolos y estimulando su despolimerización.

Las proteínas principales que estimulan el inicio y la elongación de los filamentos de actina son la **formina** y el **complejo Arp2/3** (proteína *r*elacionada con la *a*ctina). Las actividades de estas proteínas están reguladas como respuesta a diversas señales con el fin de determinar dónde se forman los filamentos dentro de la célula. Las forminas constituyen una familia de proteínas que se unen a ATP-actina y provocan la nucleación de la polimerización inicial de los monómeros de actina (**Fig. 13.4**). A continuación se mueven a lo largo del filamento en crecimiento, añadiendo nuevos monómeros a los extremos protuberantes. La nucleación de formina crea las fibras de tensión de elongación de los filamentos de actina no ramificados, el anillo contráctil, filopodia y los filamentos delgados de células musculares (véase más adelante en este capítulo). Las forminas se asocian con otra proteína de unión a actina denominada **profilina**, que se une a los monómeros de actina y estimula el intercambio de ADP unido a ATP.

Las proteínas Arp2/3 inician el crecimiento de filamentos de actina ramificados, que desempeñan un papel fundamental en el impulso del movimiento celular en la membrana plasmática (**Fig. 13.5**). Las proteínas Arp2/3 se unen a ATP-actina cerca de los extremos protuberantes de filamentos e inician la formación de una nueva rama. La actividad de las proteínas Arp2/3 está controlada por otras proteínas celulares, de manera que la for-

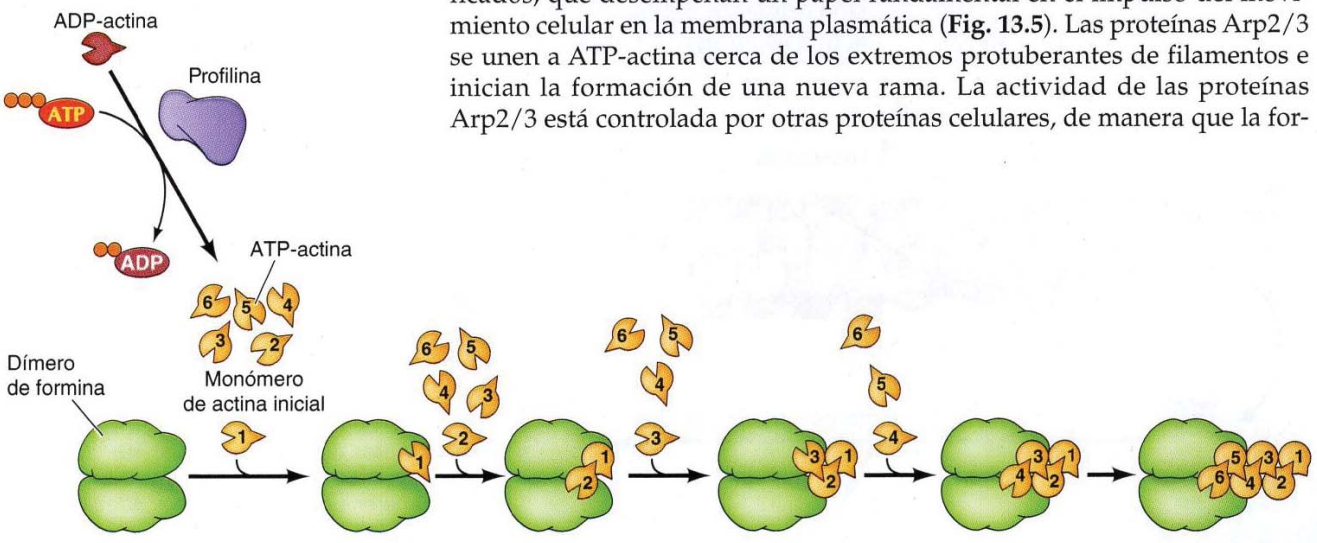


FIGURA 13.4 Inicio y crecimiento de actina por la formina. El paso limitante de la formación de los filamentos de actina es la nucleación, que requiere el alineamiento correcto de los tres primeros monómeros de actina para permitir la posterior polimerización. En el interior celular, el inicio de los filamentos de actina por la nucleación está facilitado por la proteína de unión a actina, formina. Cada subunidad del dímero de formina se une a un monómero de actina. Los monómeros de actina se mantienen en la configuración correcta para permitir la unión del tercer monómero, seguido de una rápida polimerización durante la cual la formina sigue unida al extremo protuberante. Las forminas están asociadas con la profilina, que estimula el intercambio de ADP unido por ATP en los monómeros de actina.

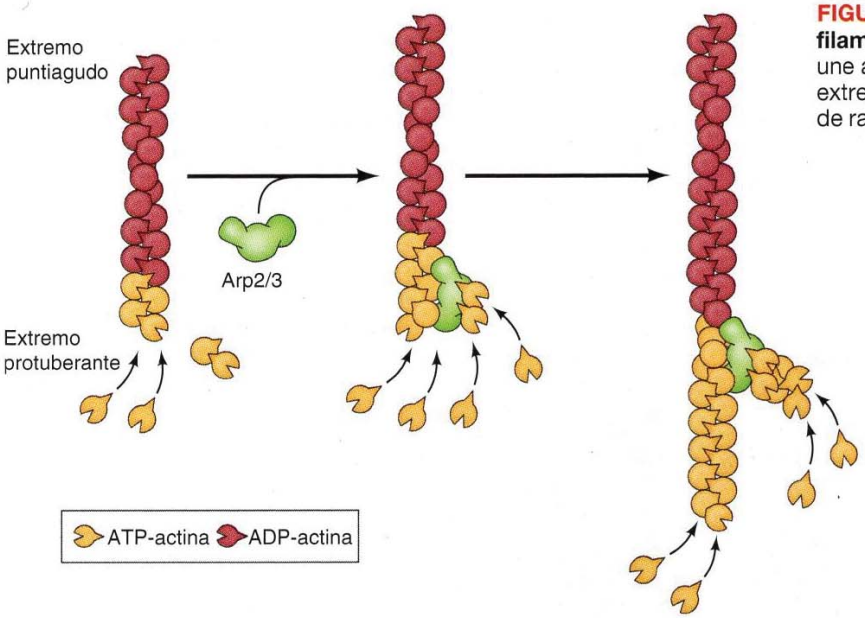


FIGURA 13.5 Iniciación de ramas en los filamentos de actina. El complejo Arp2/3 se une a los filamentos de actina cerca de los extremos protuberantes e inicia la formación de ramas.

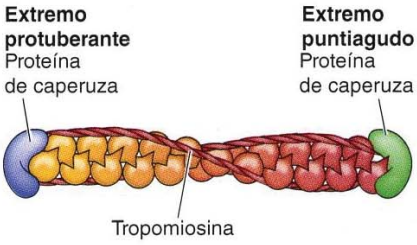


FIGURA 13.6 Estabilización de filamentos de actina. Filamentos de actina estabilizados por proteínas de caperuza que se unen a sus extremos puntiagudos o protuberantes y por proteínas de estabilización de filamentos (p. ej., tropomiosina) que se unen a lo largo de su longitud.

mación de filamentos de actina ramificados se encuentra regulada por las necesidades fisiológicas de la célula.

Muchos filamentos de actina son relativamente estables dentro de las células debido a proteínas de caperuza que se unen a sus extremos y a proteínas de estabilización de filamentos como miembros de la familia de las **tropomiosinas** (**Fig. 13.6**). Las tropomiosinas son proteínas fibrosas de 30-36 kDa que se unen en sentido longitudinal a lo largo del surco de los filamentos de actina. Debido al *splicing* alternativo, cuatro genes de tropomiosina codifican más de 40 proteínas de tropomiosina diferentes, que son notables determinantes de la posición de los filamentos de actina dentro de la célula. Otras proteínas que se unen a lo largo de los filamentos de actina actúan para enlazar los filamentos de actina en haces o redes o para mediar en la asociación de filamentos de actina con otras proteínas celulares. Más adelante en el capítulo se expondrán varios ejemplos de estas proteínas de unión a actina en términos de sus funciones específicas en la fisiología celular.

Otras proteínas de unión a actina remodelan o modifican, en lugar de estabilizar, los filamentos existentes. Un ejemplo es la proteína **cofilina**, que corta los filamentos de actina (**Fig. 13.7**). Se generan así nuevos extremos de los filamentos, que son accesibles para despolimerización de sus extremos puntiagudos o crecimiento por añadido de nuevos monómeros de actina en sus extremos protuberantes.

Como cabría esperar, las actividades de la cofilina, profilina y el complejo Arp2/3 están controlados por una variedad de mecanismos

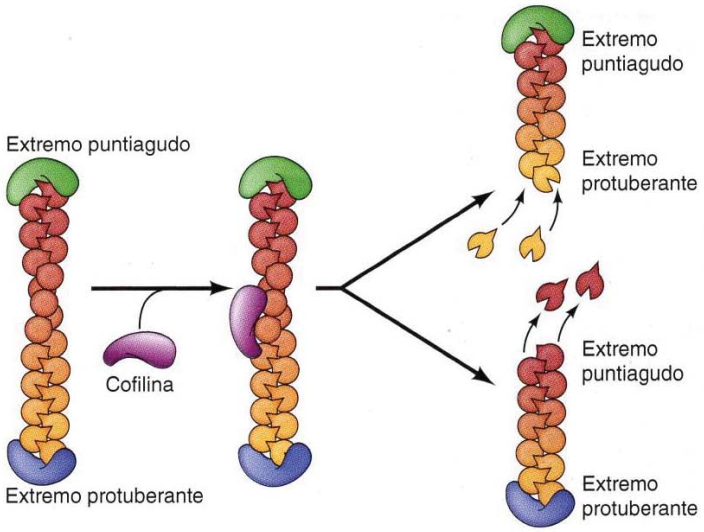


FIGURA 13.7 Corte del filamento por cofilina. La cofilina se une a los filamentos de actina y los corta. Los extremos de los filamentos recién cortados están así disponibles para la polimerización y despolimerización de los monómeros de actina.

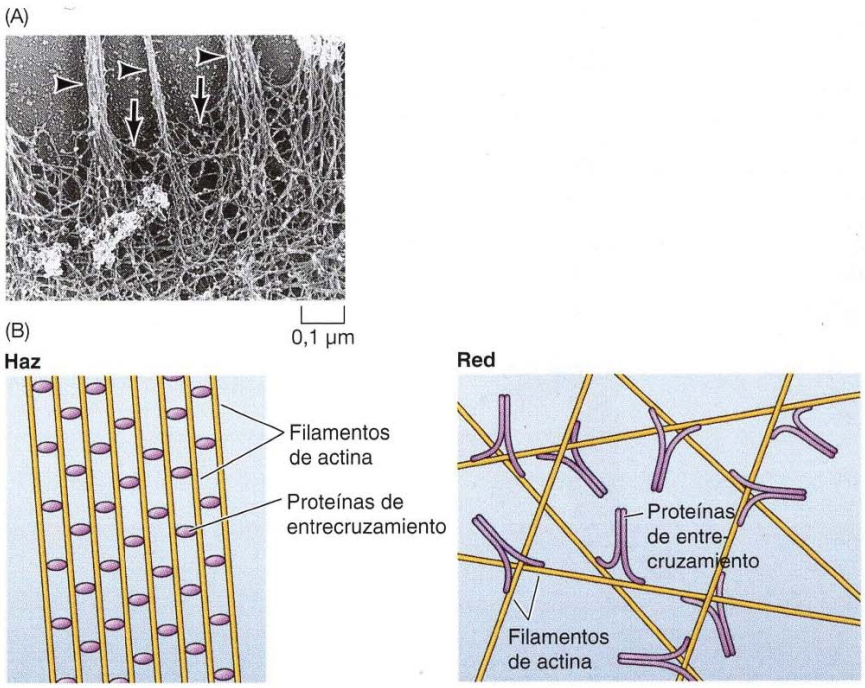


FIGURA 13.8 Haces y redes de actina. (A) Micrografía electrónica de haces de actina *(cabezas de flecha)* proyectándose desde la red de actina *(flechas)* subyacente a la membrana plasmática de un macrófago. Los haces sostienen unas proyecciones de la superficie celular llamadas micropúas o filopodios (véase Fig. 13.19). (B) Organización esquemática de los haces y las redes. Los filamentos de actina en los haces se disponen en formaciones paralelas unidos por puentes cruzados por proteínas pequeñas que alinean los filamentos estrechamente unos con otros. Por el contrario, las redes se encuentran formadas por proteínas grandes y flexibles que entrelazan filamentos ortogonales. (A, cortesía de John H. Hartwig, Brigham & Women's Hospital.)

señalizadores celulares, que permiten que la polimerización de actina se regule apropiadamente en respuesta a estímulos ambientales. Así, la cofilina, la profilina y el complejo Arp2/3 (además de otras proteínas de unión a actina) pueden actuar conjuntamente para estimular la renovación de los filamentos de actina y la remodelación del citoesqueleto de actina, lo que es necesario para una diversidad de movimientos celulares y cambios en la forma de la célula como se describe más adelante en este capítulo. Esto es una gran tarea y, en algunos tipos celulares, el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina es responsable de la mitad de la hidrólisis de ATP en la célula.

Organización de los filamentos de actina

Los filamentos individuales de actina se ensamblan en dos tipos generales de estructuras, denominadas **haces de actina** y **redes de actina**, que desempeñan papeles distintos en la célula (**Fig. 13.8**). En los haces, los filamentos de actina se unen por puentes cruzados y se disponen en estructuras paralelas estrechamente agrupadas. En las redes, los filamentos de actina se unen por puentes cruzados con una disposición ortogonal más holgada, y forman mallas tridimensionales con las propiedades de los geles semisólidos. La formación de estas estructuras está dirigida por varias proteínas de unión a la actina que entrelazan los filamentos de actina de maneras distintas (véase Tabla 13.1).

Todas las proteínas de unión a la actina relacionadas con los puentes cruzados contienen al menos dos dominios de unión a la actina, lo que les permite fijar y entrecruzar dos filamentos de actina diferentes. La naturaleza de la asociación entre estos filamentos viene entonces determinada por el tamaño y la forma de las proteínas de entrecruzamiento (véase Fig. 13.8). Las proteínas que entrelazan los filamentos de actina en haces (llamadas **proteínas formadoras de haces de actina**) suelen ser pequeñas proteínas rígidas que fuerzan a los filamentos a alinearse estrechamente unos con otros. Por otro lado, las proteínas que organizan los filamentos de actina en redes tienden a ser proteínas largas y flexibles que pueden establecer puentes de unión entre filamentos perpendiculares.

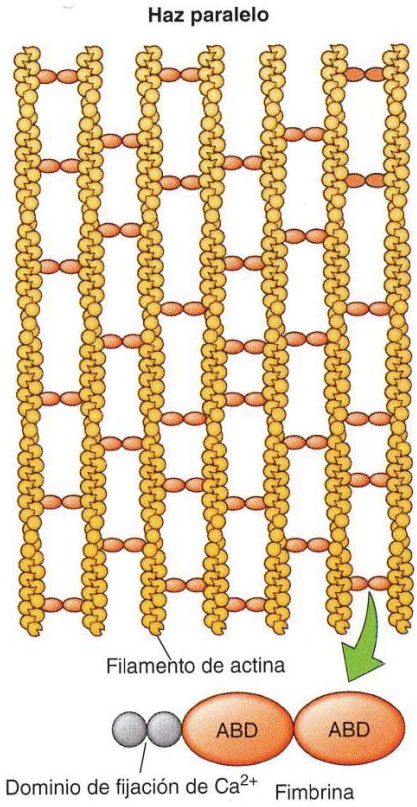


FIGURA 13.9 Proteínas formadoras de haces de actina. Los filamentos de actina se asocian en dos tipos de haces mediante diferentes proteínas formadoras de haces de actina. La fimbrina tiene dos dominios de unión a la actina adyacentes (ABD) y entrelaza filamentos de actina en haces paralelos, estrechamente empaquetados, en los que los filamentos se encuentran separados aproximadamente 14 nm. Por otro lado, los dos dominios de unión a actina separados de los dímeros de α-actinina entrelazan los filamentos en haces contráctiles más holgados y espaciados, en los que los filamentos se encuentran separados 40 nm. Tanto la fimbrina como la α-actinina contienen dos dominios de fijación de Ca^{2+} relacionados, y la α-actinina contiene cuatro dominios espaciadores en α-hélice repetidos.

Existen dos tipos de haces de actina distintos tanto estructural como funcionalmente, que implican a diferentes proteínas formadoras de haces de actina (**Fig. 13.9**). El primer tipo de haz, que contiene filamentos de actina estrechamente agrupados, alineados en paralelo (llamados **parallel bundles**), sostiene a las proyecciones de la membrana plasmática tales como las microvellosidades (véanse Figs. 13.17 y 13.18). En estos haces todos los filamentos tienen la misma polaridad, con sus extremos protuberantes adyacentes a la membrana plasmática. Un ejemplo de proteína formadora de haces, relacionada con la formación de estas estructuras es la **fimbrina**, que fue aislada por primera vez a partir de las microvellosidades intestinales, y más tarde se encontró en las proyecciones de superficie de una amplia variedad de tipos de células. La fimbrina es una proteína de 68 kDa que contiene dos dominios adyacentes de unión a la actina. Se une a los filamentos de actina en forma de monómero, manteniendo unidos a dos filamentos paralelos.

El segundo tipo de haz de actina se compone de filamentos que están más espaciados y que son capaces de contraerse, tales como los haces de actina del anillo contráctil que divide a las células en dos tras la mitosis. La estructura más holgada de estos haces (que se denominan **haces contráctiles**) refleja las propiedades de la proteína de entrecruzamiento **α-actinina**. A diferencia de la fimbrina, la α-actinina se une a la actina como un dímero, siendo cada una de las subunidades una proteína de 102 kDa que contiene un único sitio de unión a la actina. Por tanto, los filamentos entrelazados por la α-actinina se encuentran separados por una distancia mucho mayor que aquellos unidos por la fimbrina (40 nm de separación frente a 14 nm). La mayor separación entre los filamentos permite a la proteína motora miosina interaccionar con los filamentos de actina en estos haces, permitiendo (como se verá más adelante) su contracción.

En las redes los filamentos de actina se mantienen unidos mediante proteínas de unión a la actina de gran tamaño, como la **filamina** (**Fig. 13.10**). La

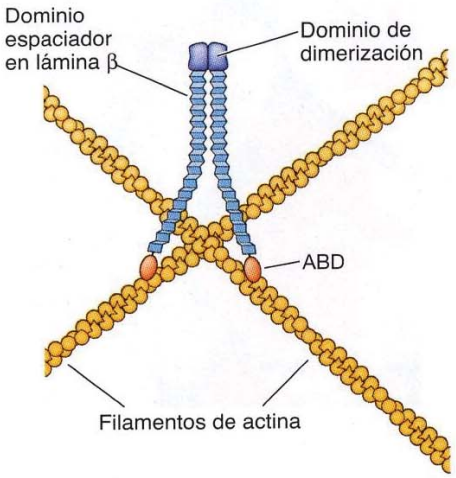


FIGURA 13.10 Redes de actina y la filamina. La filamina es un dímero de dos subunidades grandes (280 kDa), que forman una molécula flexible en forma de V y que entrelaza los filamentos de actina en redes ortogonales. El dominio de dimerización carboxilo-terminal se encuentra separado del dominio de unión a la actina amino-terminal (ABD) por dominios espaciadores en lámina β repetidos.

filamina se fija a la actina como un dímero de dos subunidades de 280 kDa. Los dominios de unión a la actina y los dominios de dimerización se encuentran en extremos opuestos de cada subunidad, por lo que el dímero de filamina es una molécula flexible en forma de V con los dominios de unión a la actina en los extremos de cada brazo. Como resultado, la filamina forma puentes cruzados entre filamentos de actina ortogonales, creando una malla tridimensional holgada. Tal y como se tratará en la próxima sección, dicha red de filamentos de actina subyace a la membrana plasmática y es un soporte estructural de la superficie de la célula.

Asociaciación de los filamentos de actina con la membrana plasmática

En la periferia de la célula hay una elevada concentración de filamentos de actina que forman una red tridimensional bajo la membrana plasmática (véase Fig. 13.8). Esta red de filamentos de actina y de proteínas de unión a la actina asociadas (denominada el **córtex celular**) determina la forma de la célula y está implicada en diversas acciones de la superficie celular, incluyendo el movimiento. De esta manera, la asociación del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática es fundamental para la estructura y la función celular.

Los glóbulos rojos sanguíneos (eritrocitos) han demostrado ser particularmente útiles para el estudio tanto de la membrana plasmática (que se tratará en el próximo capítulo) como del citoesqueleto cortical. La principal ventaja de los glóbulos rojos para estos estudios radica en que no contienen ni núcleo ni orgánulos internos, por lo que la membrana plasmática y las proteínas asociadas pueden ser aisladas fácilmente sin ser contaminadas por las diferentes membranas internas que son abundantes en otros tipos de células. Además, los eritrocitos humanos carecen de otros componentes citoesqueléticos (microtúbulos o filamentos intermedios), por lo que el citoesqueleto cortical es el determinante principal de su morfología característica en forma de discos bicóncavos (**Fig. 13.11**).

La principal proteína que proporciona la base estructural del citoesqueleto cortical en los eritrocitos es la proteína de unión a la actina, **espectrina**,

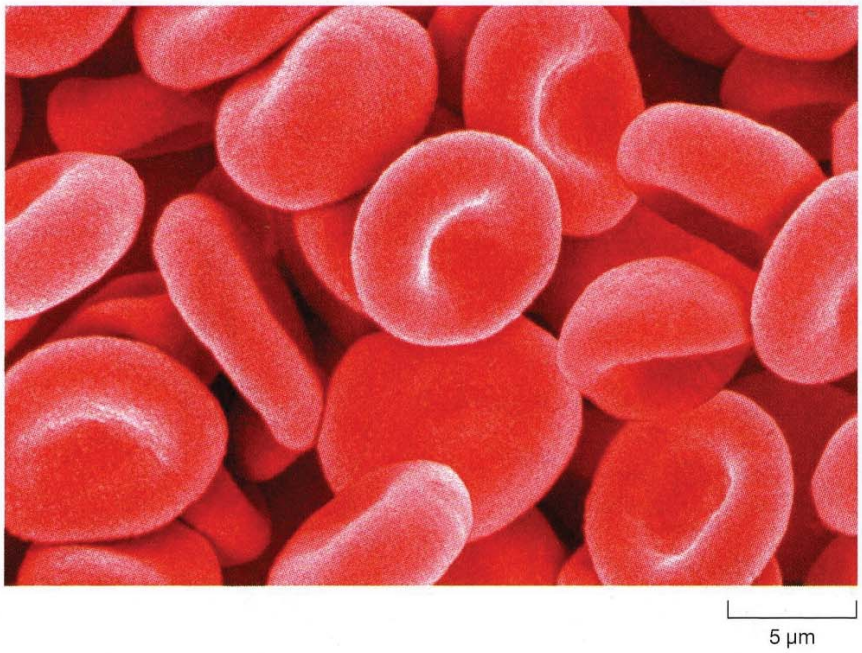


FIGURA 13.11 Morfología de los glóbulos rojos sanguíneos. Micrografía electrónica de barrido de glóbulos rojos mostrando su forma bicóncava. El color se ha añadido artificialmente.

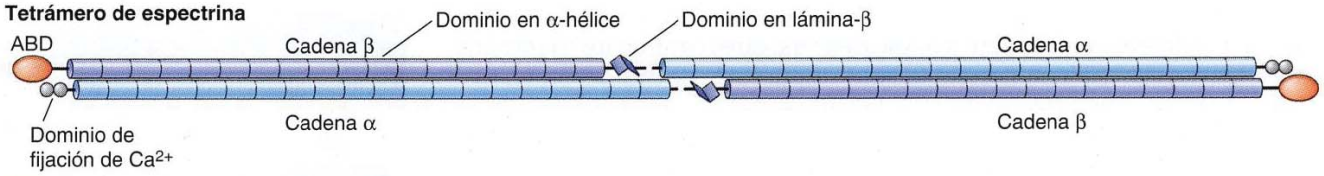
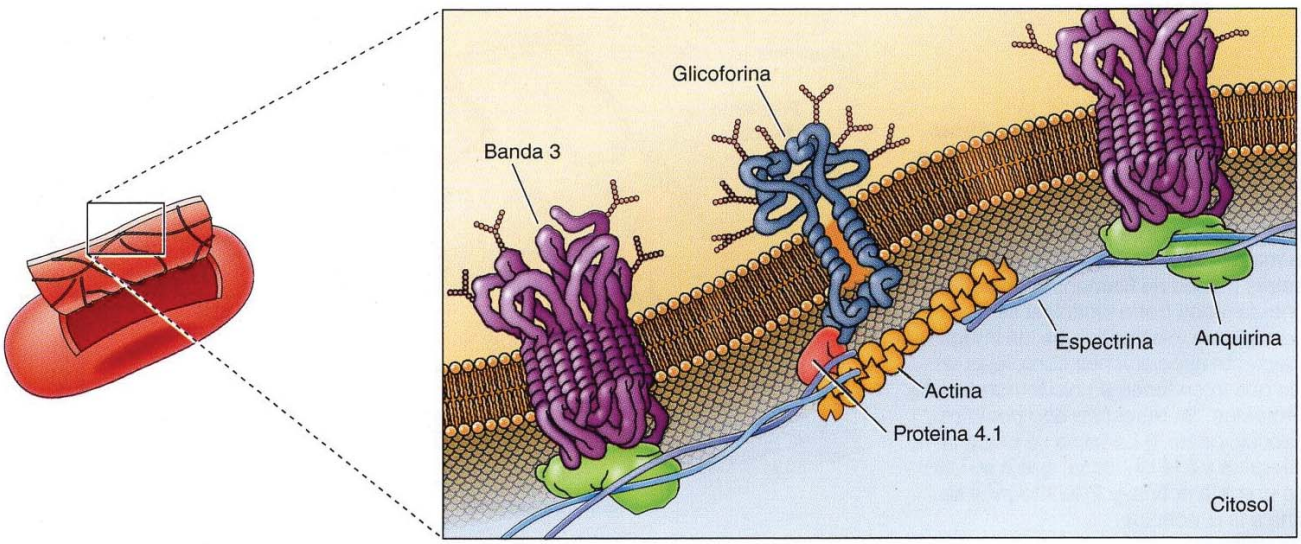


FIGURA 13.12 Estructura de la espectrina. La espectrina es un tetrámero constituido por dos cadenas α y dos β. Cada cadena β tiene un único dominio de unión a la actina (ABD) en su extremo amino terminal. Tanto las cadenas α como β contienen múltiples repeticiones de dominios espaciadores en α-hélice, que separan los dos dominios de unión de la actina del tetrámero. Cada cadena α tiene dos dominios de fijación de Ca^{2+} en su extremo carboxilo terminal.

relacionada con la filamina (**Fig. 13.12**). La espectrina pertenece a la extensa familia calponina de proteínas de unión a la actina, que incluye α-actinina, filamina y fimbrina. La espectrina eritrocitaria es un tetrámero constituido por dos cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas α y β, con un peso molecular de 240 y 220 kDa, respectivamente. Las cadenas α y β se asocian para formar tetrámeros con dos dominios de unión a la actina separados aproximadamente por 200 nm. Los extremos de los tetrámeros de espectrina se asocian con filamentos cortos de actina, dando como resultado una red de espectrina-actina que forma el citoesqueleto cortical de los glóbulos rojos (**Fig. 13.13**). Aunque la propia espectrina se une a los fosfolípidos de la membrana plasmática. El principal nexo de unión entre la red de espectrina-actina y la membrana plasmática lo proporciona la proteína denominada **anquirina**, que se une tanto a la espectrina como al dominio citoplasmático de una proteína transmembrana abundante denominada banda 3. Un nexo adicional entre la red de espectrina-actina y la membrana plasmática viene dado por la proteína 4.1, que se fija a las uniones de espectrina-actina así como reconoce el dominio citoplasmático de la glicoforina (otra proteína transmembrana abundante).

Otros tipos de células contienen uniones entre el citoesqueleto cortical y la membrana plasmática que son similares a las observadas en los glóbulos rojos. Las proteínas relacionadas con la espectrina, la anquirina y la proteína 4.1 se expresan en una gran variedad de tipos celulares, donde realizan funciones análogas a aquellas descritas para los eritrocitos. Por ejemplo, otro miembro de este grupo de proteínas relacionadas con la espectrina es la **distrofina**, que tiene un interés especial debido a que es el producto del gen responsable de dos tipos de distrofias musculares (la de Duchenne y Becker). Estas enfermedades congénitas asociadas al cromosoma X provocan una degeneración progresiva del músculo esquelético, y los pacientes

FIGURA 13.13 Asociación del citoesqueleto cortical eritrocitario con la membrana plasmática. La membrana plasmática se asocia con una red de espectrina entrelazada por filamentos cortos de actina. La red de espectrina-actina se une a la membrana por la anquirina, que se une tanto a la espectrina como a la abundante proteína transmembrana banda 3. Un nexo adicional lo proporciona la unión de la proteína 4.1 a uniones de espectrina/actina y a glicoforina (otra proteína transmembrana abundante).



con la forma más severa de la enfermedad (distrofia muscular de Duchenne) generalmente mueren en la adolescencia o alrededor de los veinte años de edad. La clonación molecular del gen responsable de este desorden reveló que codifica una proteína de gran tamaño (427 kDa) que se encuentra ausente o alterada en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne o Becker, respectivamente. La secuencia de distrofina la identificó como una proteína de unión a actina. Al igual que la espectrina, la distrofina forma dímeros que fijan los filamentos de actina a las proteínas transmembrana de la membrana plasmática de la célula muscular. Estas proteínas transmembrana a su vez fijan el citoesqueleto a la matriz extracelular, lo que desempeña un papel importante en mantener la estabilidad celular durante la contracción muscular.

A diferencia de la superficie uniforme de los glóbulos rojos sanguíneos, la mayoría de las células tienen regiones especializadas en la membrana plasmática que establecen contactos con células adyacentes, la matriz extracelular (estudiada en el Cap. 15). Estas regiones también sirven como puntos de unión para los haces de filamentos de actina que anclan el citoesqueleto a las zonas de contacto celular. Estas uniones de filamentos de actina resultan particularmente evidentes en los fibroblastos en cultivo (**Fig. 13.14**). Estos fibroblastos en cultivo segregan proteínas de la matriz extracelular que se adhieren a la superficie plástica de la placa de cultivo. Entonces los fibroblastos se unen a la placa de cultivo mediante la unión a la matriz extracelular de unas proteínas transmembrana (denominadas **integrinas**). Los sitios de anclaje son regiones discretas (llamadas **adhesiones focales**) que también sirven como sitios de sujeción para unos haces de filamentos de actina de gran tamaño denominados **fibras de estrés**.

Las fibras de estrés son haces contráctiles de filamentos de actina, entrelazados por α-actinina y estabilizados mediante tropomiosina, que anclan a la célula y ejercen tensión sobre el sustrato. Están unidas a la membrana plasmática en las adhesiones focales a través de la integrina. Estas asociaciones, que son complejas y no bien entendidas, pueden estar mediadas por otras proteínas, incluyendo la **talina** y la **vinculina** (**Fig. 13.15**). Por ejemplo, tanto la talina como la α-actinina se unen a los dominios citoplasmáticos de las integrinas. La talina también se une a la vinculina, que a su vez se une a la actina. Otras proteínas encontradas en las adhesiones focales también pueden participar en el anclaje de los filamentos de actina, y una combina-

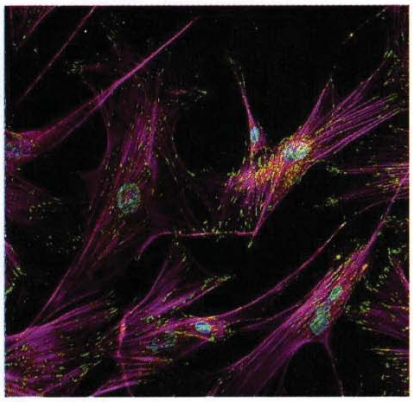


FIGURA 13.14 Fibras de estrés y adhesiones focales. Microscopia por fluorescencia de fibroblastos en los que las fibras de estrés de actina están teñidas de color morado y las adhesiones focales lo están de verde brillante con anticuerpo contra la vinculina.

◆ Además de su papel estructural en las uniones adherentes, la β-catenina es un componente crítico de la vía de señalización Wnt donde funciona como un activador de la transcripción (véase Cap. 16).

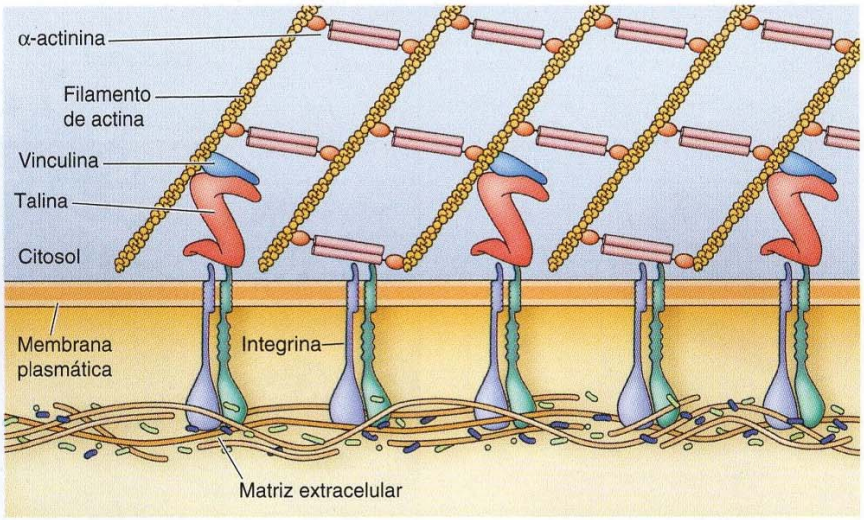


FIGURA 13.15 Anclaje de las fibras de estrés a la membrana plasmática en las adhesiones focales. Las adhesiones focales están mediadas por la unión de las integrinas a proteínas de la matriz extracelular. Las fibras de estrés (haces de filamentos de actina entrelazados por α-actinina) se unen al dominio citoplasmático de las integrinas mediante asociaciones complejas en las que intervienen un cierto número de proteínas. Se muestran dos posibles asociaciones: 1) La talina se une a la integrina y a la vinculina, que a su vez se une a la actina, y 2) la integrina se une a la α-actinina.

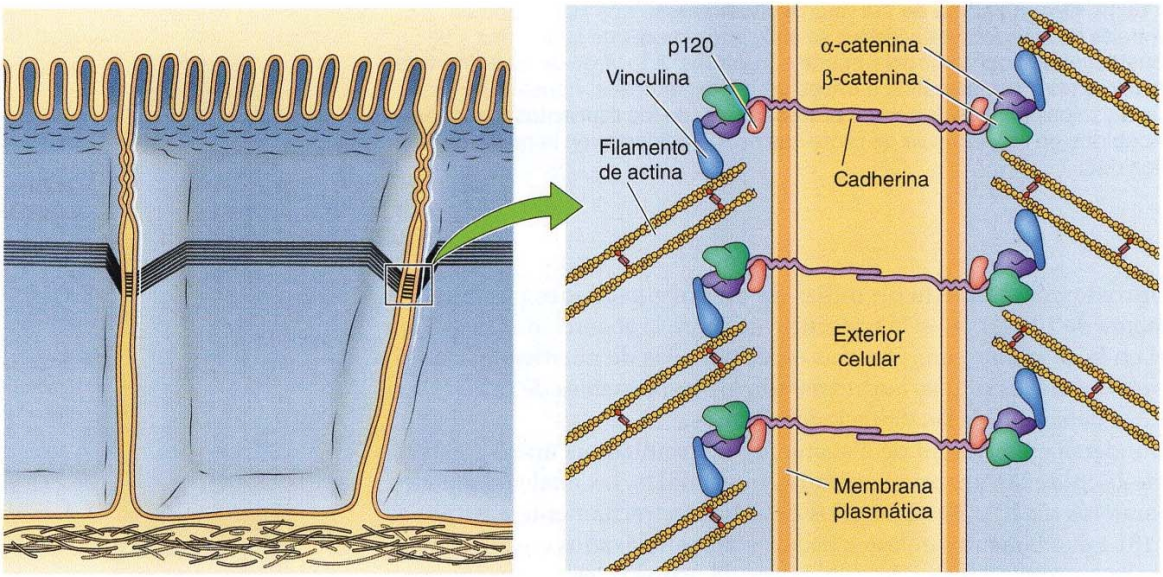


FIGURA 13.16 Anclaje de los filamentos de actina a las uniones de adherencia. Los contactos célula-célula en las uniones de adherencia están mediados por cadherinas, que sirven como sitios de unión de los haces de actina. En las capas de células epiteliales estas uniones forman un cinturón continuo de filamentos de actina alrededor de cada célula. Las cadherinas son proteínas transmembrana que unen β-catenina y p120, que regula la estabilidad de la unión. De igual modo, β-catenina se une a α-catenina, que media en la asociación de filamentos de actina con uniones de adherencia a través de la interacción con vinculina.

FIGURA 13.17 Micrografía electrónica de microvellosidades. Las microvellosidades de las células epiteliales intestinales son proyecciones digitiformes de la membrana plasmática. Se sostienen mediante haces de actina anclados en una densa región del córtex llamada la red terminal. (Cortesía de Nobutaka Hirokawa.)

ción de estas interacciones puede ser la responsable de la unión de los filamentos de actina a la membrana plasmática.

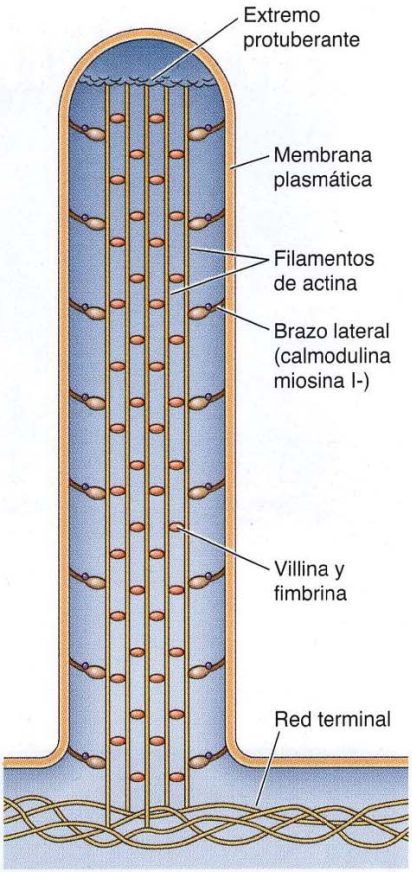
El citoesqueleto de actina se encuentra anclado de forma similar a regiones de contacto célula-célula denominadas **uniones de adherencia** (**Fig. 13.16**). En las capas de células epiteliales estas uniones forman una estructura continua en forma de cinturón (denominada **cinturón circunferencial**) alrededor de cada célula, de tal manera que un haz contráctil de filamentos de actina subyacente se une a la membrana plasmática. El contacto entre las células en las uniones de adherencia está mediado por proteínas transmembrana llamadas **cadherinas**, que serán tratadas en el Capítulo 15. Las cadherinas forman un complejo con las proteínas citoplasmáticas denominadas **cateninas**, interaccionan con la vinculina y otras proteínas de unión a actina y anclan los filamentos de actina en la membrana plasmática.

Microvellosidades

La superficie de la mayoría de las células tiene diversas protuberancias o extensiones que intervienen en el movimiento celular, la fagocitosis, o en funciones especializadas tales como la absorción de los nutrientes. La mayoría de estas extensiones celulares superficiales se basan en filamentos de actina, que están organizados en haces o redes relativamente estables o que se reorganizan rápidamente.

Las protuberancias de la superficie celular basadas en la actina mejor caracterizadas son las **microvellosidades**, extensiones digitiformes de la membrana plasmática que son particularmente abundantes en la superficie de las células implicadas en la absorción, como las células epiteliales que tapizan el intestino (**Fig. 13.17**). Las microvellosidades de estas células forman una capa sobre la superficie apical (denominada **borde en cepillo**) que

FIGURA 13.18 Organización de las microvellosidades. Los filamentos de actina centrales de las microvellosidades se entrelazan mediante la fimbrina y la villina, constituyendo haces estrechamente agrupados. A lo largo de su estructura se unen a la membrana plasmática a través de brazos laterales, constituidos por calmodulina y miosina I. Los extremos protuberantes de los filamentos de actina están embebidos en una cápsula de proteínas no identificadas en la punta de la microvellosidad.



consta aproximadamente de un millar de microvellosidades por célula y que aumenta de 10 a 20 veces la superficie útil para la absorción. Además de su papel en la absorción, unas formas especializadas de microvellosidades, los **esterocilios** de las células auditivas, son las responsables de la audición mediante la detección de las vibraciones sonoras.

Su abundancia y facilidad de aislamiento ha facilitado el análisis estructural detallado de las microvellosidades intestinales, las cuales contienen haces paralelos de 20 a 30 filamentos de actina estrechamente agrupados (**Fig. 13.18**). Los filamentos en estos haces están entrelazados en parte por la fimbrina, una proteína formadora de haces de actina (vista anteriormente, Fig. 13.19) que está presente en las proyecciones superficiales de varios tipos de células. Sin embargo, la proteína formadora de haces de actina más importante en las microvellosidades intestinales es la **villina**, una proteína de 95 kDa presente en las microvellosidades de sólo unos pocos tipos de células especializadas, como las que tapizan el intestino y los túbulos renales y las de las uniones celulares. A lo largo de su estructura, los haces de actina de las microvellosidades se encuentran unidos a la membrana plasmática a través de brazos laterales constituidos por la proteína fijadora de calcio calmodulina en asociación con la miosina I, la cual puede estar implicada en el movimiento de la membrana plasmática a lo largo del haz de actina de la microvellosidad. En su base, los haces de actina están anclados en una región rica en espectrina de la corteza de actina llamada la red terminal, que entrelaza y estabiliza las microvellosidades.

Protrusiones de la superficie celular y movimiento de las células

A diferencia de las microvellosidades, muchas protuberancias superficiales son estructuras transitorias que se forman en respuesta a estímulos ambientales e intervienen en el movimiento celular. El movimiento de las células a través de una superficie representa una forma básica de locomoción celular empleada por una amplia variedad de diferentes clases de células. Entre los ejemplos se incluyen la reptación de las amebas, la migración de las células embrionarias durante el desarrollo, la invasión de tejidos por leucocitos para combatir las infecciones, la migración de células que intervienen en la curación de las heridas y la extensión de las células cancerosas durante las metástasis. Tipos de movimientos similares son también responsables de la fagocitosis y de la extensión de las prolongaciones de las células nerviosas durante el desarrollo del sistema nervioso.

Todos estos movimientos se basan en extensiones locales de la membrana plasmática que se prolongan desde el borde delantero de una célula en movimiento (**Fig. 13.19**). Los **pseudópodos** son extensiones de un ancho moderado, basados en filamentos de actina entrelazados en una red tridimensional, que son responsables de la fagocitosis y del movimiento de las amebas sobre una superficie. Los **lamelipodios** son extensiones anchas, laminares, del borde apical de los fibroblastos, que de forma similar contienen una red de filamentos de actina. Los **filopodios** son prolongaciones muy delgadas de la membrana plasmática, sustentadas por haces de actina, que se extienden desde los lamelipodios. La formación y retracción de estas

VÍDEO 13.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.1

Lamelipodios. Los lamelipodios son extensiones de tipo laminar en el borde delantero de los fibroblastos.

◆ Ciertas bacterias patogénicas (p. ej., *Listeria*) desvían la dinámica normal del citoesqueleto de actina para desplazarse a través del citoplasma de la célula hospedadora e infectar células vecinas.

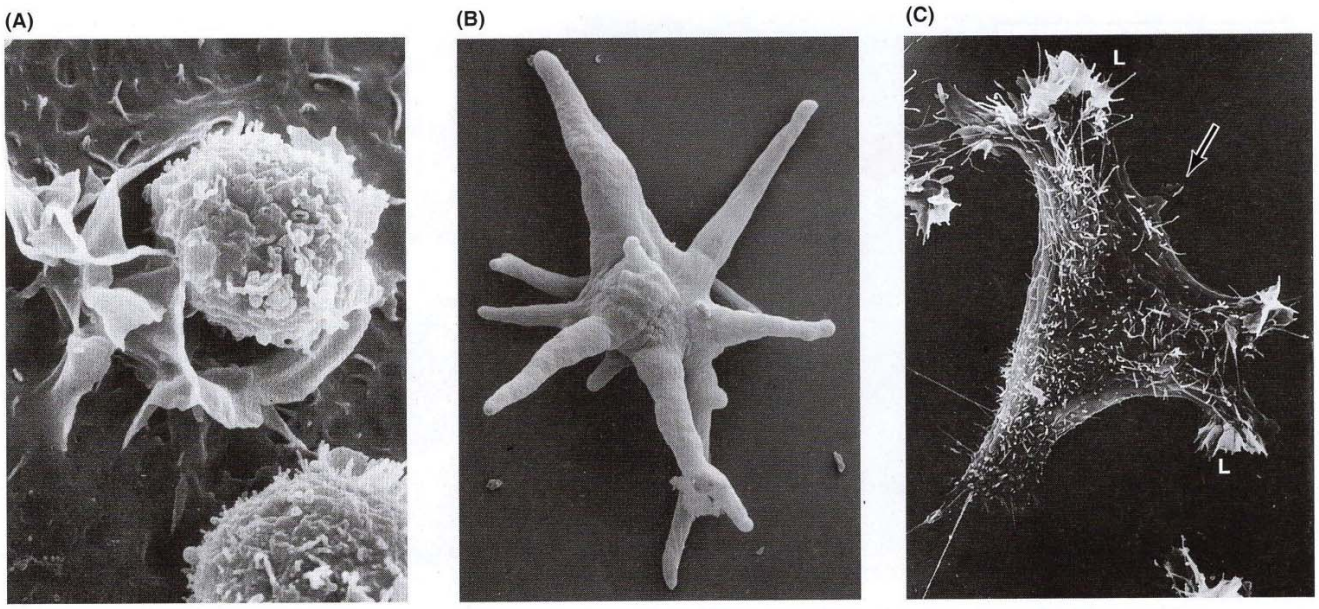


FIGURA 13.19 Ejemplos de proyecciones celulares superficiales implicadas en la fagocitosis y el movimiento. (A) Micrografía electrónica de barrido mostrando pseudópodos de un macrófago engullendo una célula tumoral durante la fagocitosis. (B) Ameba con varios pseudópodos extendidos. (C) Célula de cultivo tisular mostrando lamelipodios (*L*) en el borde delantero de un fibroblasto y filopodios *(flecha)*.

VÍDEO 13.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.2

Movimiento celular. El movimiento celular a través de una superficie supone la extensión del borde delantero, la fijación y la retracción.

estructuras durante el movimiento celular se basa en el ensamblaje y desensamblaje regulado de los filamentos de actina.

El movimiento celular o la extensión de las largas prolongaciones de la célula se basan en una serie de movimientos coordinados (**Fig. 13.20**). En primer lugar, deben extenderse protrusiones del tipo de pseudópodos, lamelipodios o filopodios para formar un borde delantero de la célula. Los movimientos iniciales de la mayoría de las células están mediados por la extensión de filopodios, que posteriormente se incorporan en lamelipodios. Estas extensiones deben fijarse posteriormente al sustrato a través del cual se mueve la célula. Por último, el borde trasero de la célula ha de disociarse del sustrato y retraerse en el cuerpo celular. Diversos experimentos indican que la extensión del borde delantero implica la ramificación y polimerización de los filamentos de actina. Por ejemplo, la inhibición de la polimerización de actina (p. ej., por tratamiento con citocalasina) bloquea la formación de las protrusiones de la superficie celular. Como se describe más adelante, el proceso subyacente a la extensión de las protrusiones celulares es la fuerza de la polimerización de los filamentos de actina contra la membrana plasmática en el borde delantero.

En la mayor parte de los casos, las células se mueven como respuesta a señales de otras células o del entorno. Por ejemplo, en la curación de las heridas, las células del borde de un corte se mueven a través de la matriz extracelular para cubrir la herida. La formación de protrusiones de la superficie celular en respuesta a los estímulos extracelulares está regulada por pequeñas proteínas de unión a GTP de la familia **Rho** (Cdc42, Rho y Rac), que es-

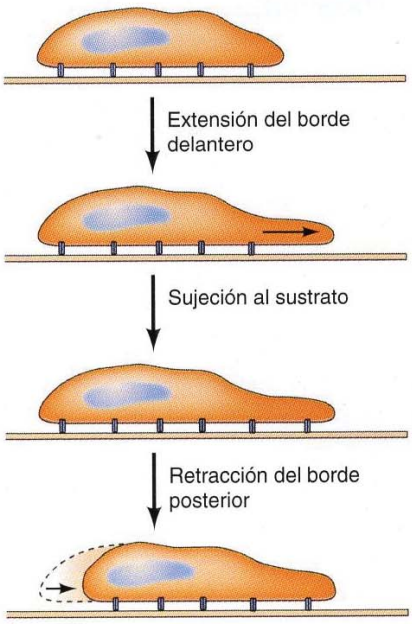


FIGURA 13.20 Migración celular. El movimiento de las células a través de una superficie puede verse como tres fases de movimientos coordinados: (1) extensión del borde delantero, (2) sujeción del borde delantero al sustrato, y (3) retracción del borde posterior de la célula en el cuerpo celular.

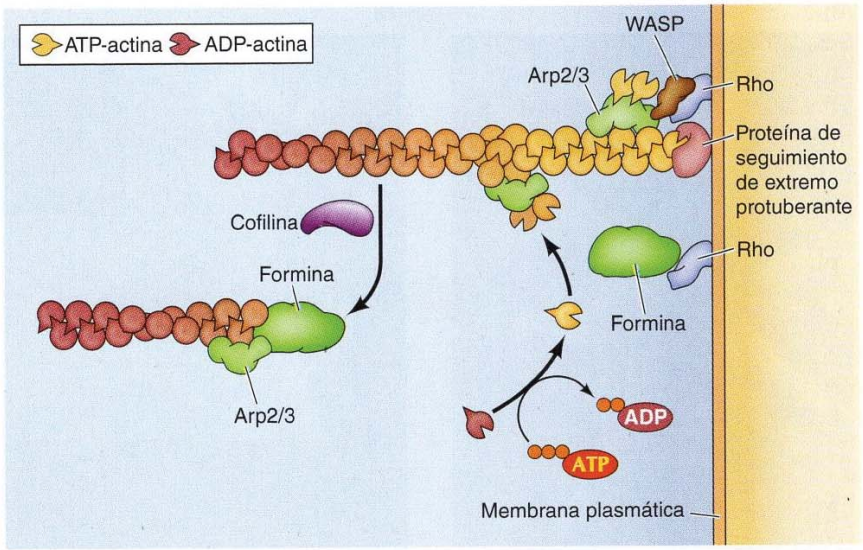


FIGURA 13.21 Remodelación del filamento de actina en el borde delantero. Los miembros de la familia Rho activan WASP y Arp2/3, así como formina, lo que conduce al inicio y el alargamiento de filamentos de actina ramificados. La profilina activa monómeros de ADP-actina a través del intercambio ADP/ATP para promover la extensión del filamento. La escisión de filamentos existentes por la cofilina proporciona nuevos extremos protuberantes para el inicio y el crecimiento de nuevos filamentos.

tán relacionadas con las proteínas Rac y que se abordan más adelante en el Capítulo 16. Las señales que estimulan el movimiento celular activan los receptores en la membrana plasmática, lo que conduce a la activación de miembros de la familia Rho, que actúan para promover la polimerización de la actina (**Fig. 13.21**). Los miembros de la familia Rho activan las proteínas de la familia **WASP** que estimulan el complejo Arp2/3 e inician el crecimiento de filamentos de actina ramificados. Los miembros de la familia Rho activan también las forminas, que extienden los filamentos ramificados iniciados por el complejo Arp2/3 e inician los filamentos lineales. La cofilina también desempeña un papel importante en la remodelación de la red de actina mediante la escisión de filamentos existentes y el suministro de nuevos extremos protuberantes como soporte de la ramificación y el crecimiento de los filamentos. Los filamentos de actina en crecimiento empujan las membranas plasmáticas y activan la formación de protrusiones de las superficies celulares. Para concentraciones locales elevadas de ATP-actina, generadas por la profilina, el crecimiento de los extremos protuberantes de los filamentos de actina es energéticamente favorable y puede generar una fuerza considerable. Aunque un solo filamento no ejercería suficiente fuerza para extender la membrana celular, muchos de ellos lo hacen con facilidad.

A medida que los nuevos filamentos de actina se extienden en el proceso celular en crecimiento, proporcionan vías (junto con microtúbulos reorganizados) para el suministro de vesículas que contienen lípidos y proteínas necesarios para que prosiga la extensión. La fijación de la célula a una superficie requiere así la reconstrucción de adhesiones al sustrato celular. En células de movimiento lento, como las células epiteliales o los fibroblastos, la fijación implica la formación de adhesiones focales (véase Fig. 13.15). Las células que se mueven con mayor rapidez, como las amebas o los leucocitos, forman contactos más difusos con el sustrato, cuya composición molecular no se conoce.

Entre las proteínas de mercancía suministradas a la protrusión celular en crecimiento por los filamentos de actina y los microtúbulos figuran las proteínas de agrupación de actinas, necesarias para la formación de haces de actina y fibras de estrés, junto con proteínas de adhesión focal, como la talina y la vinculina. La reconstrucción de adhesiones focales tiene lugar en dos etapas: la aparición de pequeños complejos focales que contienen algunos filamentos de actina fijos a integrinas y el crecimiento de dichos complejos focales para formar adhesiones focales maduras (ilustradas en la Fig. 13.15).

VÍDEO 13.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.3

Movimiento inducido por filamentos de actina. La formación de lamelipodios durante el movimiento celular se basa en el ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina.

La vinculina y la talina son activadas por el contacto con los lípidos de la membrana plasmática. Activan las integrinas para la unión a la matriz extracelular y conectan las integrinas con los filamentos de actina. El desarrollo de adhesiones focales exige también la formación de fibras de estrés (véase Fig. 13.14), que es estimulada por Rho como consecuencia de la activación de formina y miosina II (tal como se aborda en la siguiente sección de este capítulo).

La fase final de la migración celular, la retracción del borde trasero, implica la acción de pequeñas proteínas de unión a ATP de las familias Arf (véase Capítulo 11) y Rho, que regulan la descomposición de adhesiones focales existentes y estimulan la endocitosis de la membrana plasmática en el borde trasero de la célula. Las fibras de estrés conectadas a las nuevas adhesiones focales en el borde delantero tiran entonces hacia delante del borde trasero de la célula.

Motores de miosina

Los filamentos de actina, generalmente asociados con la miosina, son los responsables de muchos tipos de movimientos celulares. La **miosina** es el prototipo de **motor molecular** —una proteína que convierte energía química en forma de ATP en energía mecánica, generando de esta manera fuerza y movimiento—. El tipo de movimiento más sorprendente es la contracción muscular, que ha proporcionado el modelo para comprender las interacciones actina-miosina y la actividad motora de las moléculas de miosina. Sin embargo, las interacciones entre la actina y la miosina son las responsables no sólo de la contracción muscular sino también de diversos tipos de movimientos de las células no musculares, incluyendo la división celular y el transporte intracelular de vesículas y orgánulos, por lo que estas interacciones desempeñan un papel central en la biología celular.

Contracción muscular

Las células musculares están altamente especializadas en una única tarea, la contracción, y es esta especialización en su estructura y función lo que convierte al músculo en el prototipo para el estudio del movimiento a nivel molecular y celular. Existen tres tipos distintos de células musculares en los vertebrados: músculo esquelético, responsable de todos los movimientos voluntarios; músculo cardíaco, que bombea la sangre desde el corazón; y músculo liso, responsable de los movimientos involuntarios de órganos tales como el estómago, intestino, útero y vasos sanguíneos. Tanto en el músculo esquelético como en el músculo cardíaco, los elementos contráctiles del citoesqueleto aparecen en estructuras altamente organizadas que dan lugar al patrón característico de estriaciones transversales. La caracterización de estas estructuras en el músculo esquelético es lo que nos ha permitido comprender la contracción muscular, y otros movimientos celulares basados en la miosina, a nivel molecular.

Los músculos esqueléticos son haces de **fibras musculares**, que son células individuales grandes (de aproximadamente 50 µm de diámetro y varios centímetros de longitud) formadas por la fusión de muchas células individuales durante el desarrollo (**Fig. 13.22**). La mayor parte del citoplasma está constituido por **miofibrillas**, que son haces cilíndricos de dos tipos de filamentos: filamentos gruesos de miosina (aproximadamente de 15 nm de diámetro) y filamentos delgados de actina (alrededor de 7 nm de diámetro). Cada miofibrilla se estructura a modo de una cadena de unidades contráctiles llamadas **sarcómeros**, que son los responsables de la apariencia estriada de los músculos cardíaco y esquelético.

◆ Las moléculas que regulan la actividad de las células de músculo liso son medicamentos importantes. Por ejemplo, el albuterol, un medicamento que relaja los músculos lisos, se emplea para el tratamiento de asma y para prevenir el parto prematuro en mujeres embarazadas. Por el contrario, la oxitocina, una hormona que estimula la contracción muscular, se administra para inducir el parto.

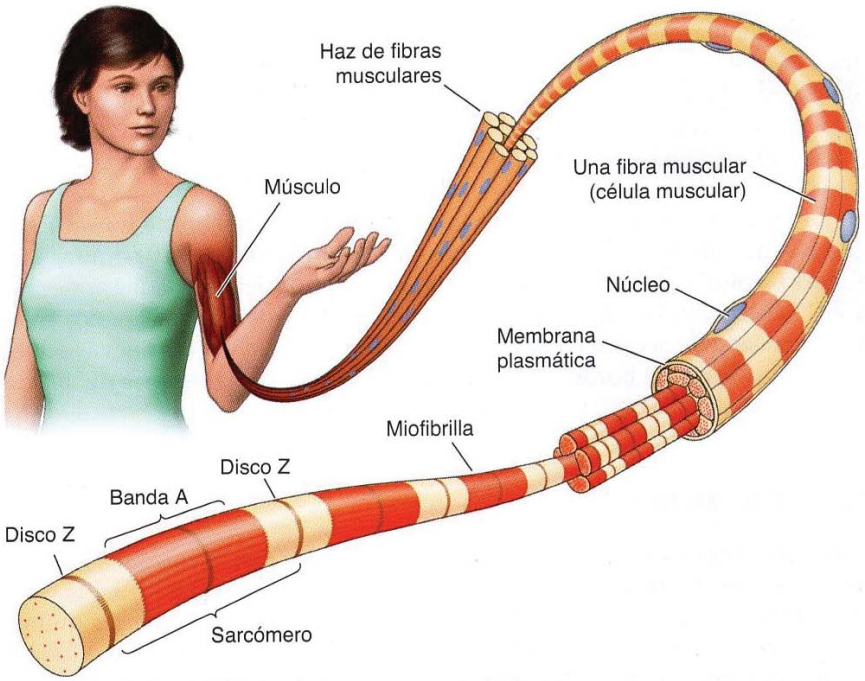


FIGURA 13.22 Estructura de las células musculares. Los músculos se componen de haces de células individuales largas (llamadas fibras musculares) que se forman por fusión celular y que contienen múltiples núcleos. Cada fibra muscular contiene muchas miofibrillas, que a su vez son haces de filamentos de actina y miosina organizados en una cadena de unidades repetidas llamadas sarcómeros, unidos por los discos Z.

Los sarcómeros (que miden aproximadamente 2,3 µm de longitud) constan de varias regiones diferenciadas, discernibles por microscopia electrónica, lo que permitió revelar el mecanismo de la contracción muscular (**Fig. 13.23**). Los extremos de cada sarcómero vienen delimitados por el disco Z. Dentro de cada sarcómero alternan bandas oscuras (llamadas bandas A porque son *anisótropas* cuando se observan con luz polarizada) con bandas claras (llamadas bandas I por ser *i*sótropas). Estas bandas se corresponden con la presencia o ausencia de filamentos de miosina. Las bandas I solamente contienen filamentos delgados (de actina), mientras que las bandas A contienen filamentos gruesos consistentes en miosina. Los filamentos de actina y miosina se solapan en regiones periféricas de la banda A, mientras que una región intermedia (llamada zona H) contiene sólo miosina. Los filamentos de actina se unen por sus extremos protuberantes al disco Z, que contiene la proteína de entrecruzamiento α-actinina. Los filamentos de miosina se unen en la zona media del sarcómero, la línea M.

La base para comprender la contracción muscular es el **modelo de deslizamiento de los filamentos**, propuesto por primera vez en 1954 por Andrew Huxley y Ralph Niedergerke y por Hugh Huxley y Jean Hanson (**Fig. 13.24**). Durante la contracción muscular, cada sarcómero se encoge, acercando los discos Z. La amplitud de la banda A no varía, pero tanto las bandas I como la zona H casi desaparecen por completo. Estos cambios se explican porque los filamentos de actina y miosina se deslizan uno sobre otro, por lo que los filamentos de actina ocupan la banda A y la zona H. Por tanto, la contracción muscular se debe a la interacción entre los filamentos de actina y miosina que genera el movimiento relativo de uno respecto al otro. La base molecular de esta interacción es la unión de la miosina a los filamentos

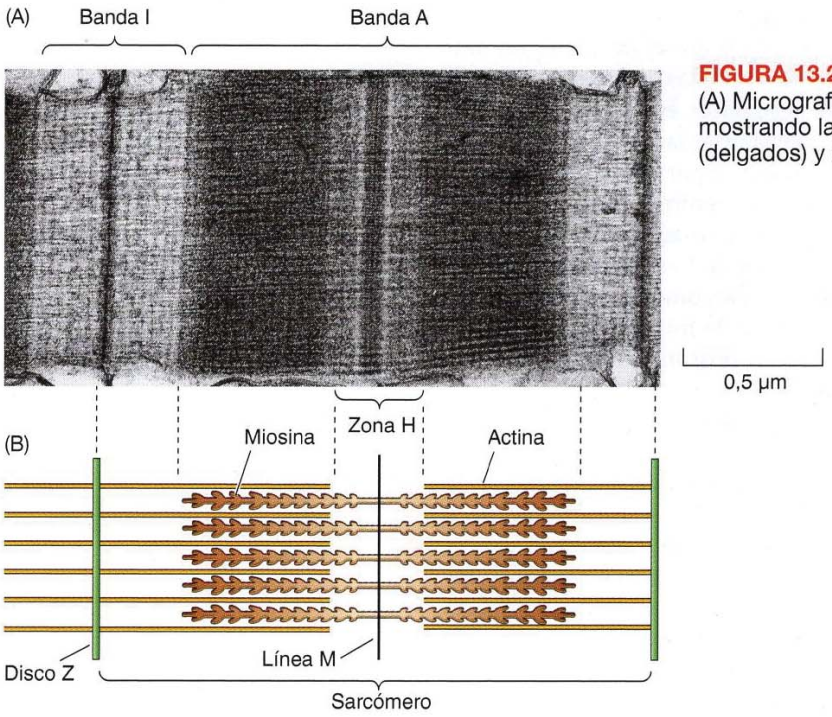


FIGURA 13.23 Estructura del sarcómero. (A) Micrografía electrónica de un sarcómero. (B) Diagrama mostrando la organización de los filamentos de actina (delgados) y miosina (gruesos) en las regiones indicadas.

de actina, lo que permite a la miosina funcionar como un motor que dirige el deslizamiento de los filamentos.

El tipo de miosina presente en el músculo (**miosina II**) es una proteína muy grande (aproximadamente 500 kDa) constituida por dos cadenas pesadas idénticas (alrededor de 200 kDa cada una) y dos pares de cadenas ligeras (alrededor de 20 kDa cada una) (**Fig. 13.25**). Cada cadena pesada consta de una cabeza globular y de una cola larga en α-hélice. Las colas en α-hélice de dos cadenas pesadas se enrollan una alrededor de la otra en una estructura de espiral enrollada (*coiled-coil*) para formar un dímero, y dos cadenas ligeras se asocian con el cuello de cada región de la cabeza para formar la molécula completa de miosina II.

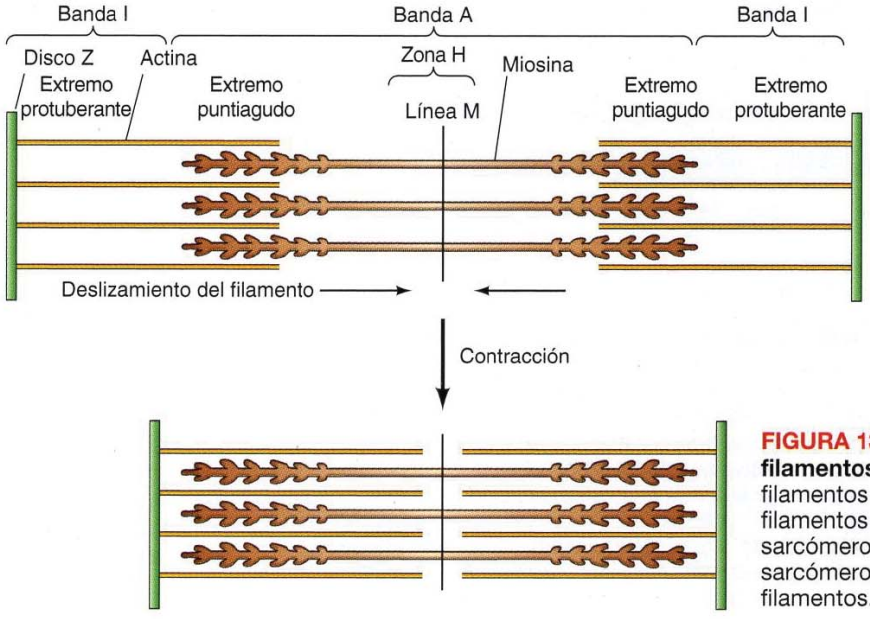


FIGURA 13.24 Modelo de deslizamiento de los filamentos de la contracción muscular. Los filamentos de actina se deslizan sobre los filamentos de miosina hacia la zona media del sarcómero. El resultado es el acortamiento del sarcómero sin ningún cambio en la longitud de los filamentos.

Los filamentos gruesos del músculo están constituidos por varios cientos de moléculas de miosina, unidas por interacciones entre sus colas, en una disposición paralela escalonada (**Fig. 13.26**). Las cabezas globulares de miosina se unen a la actina, formando puentes cruzados entre los filamentos gruesos y delgados. Es importante señalar que la orientación de las moléculas de miosina de los filamentos gruesos se invierte a partir de la línea M del sarcómero. De igual forma, la polaridad de los filamentos de actina (los cuales se unen a los discos Z por sus extremos protuberantes) se invierte a partir de la línea M, por lo que la orientación relativa de los filamentos de actina y miosina es la misma en ambas mitades del sarcómero. La contracción procede del movimiento de los grupos de cabeza de miosina a lo largo del filamento de actina en la dirección del extremo protuberante. Este movimiento desliza los filamentos de actina desde ambos lados del sarcómero hacia la línea M, lo que acorta el sarcómero y tiene como resultado la contracción muscular.

La actividad de la miosina como motor molecular está alimentada por los grupos de cabeza de miosina, que se unen a ATP y lo hidrolizan para proporcionar la energía que impulsa el movimiento. Esta transformación de energía química en movimiento se realiza mediante cambios en la forma de la miosina debidos a la unión del ATP. El ATP provoca repetidos ciclos de interacción entre las cabezas de miosina y la actina. Durante cada ciclo, los cambios conformacionales en la miosina conducen al movimiento de las cabezas de miosina a lo largo de los filamentos de actina.

Se ha obtenido un modelo molecular para la función de miosina de la estructura tridimensional de la miosina y de los estudios *in vitro* del movimiento de la miosina a lo largo de los filamentos de actina (**Fig. 13.27**). El ciclo comienza con la miosina (en ausencia de ATP) unida fuertemente a la actina. La unión de ATP disocia el complejo miosina-actina y la hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional en la miosina. Este cambio afecta a la región del cuello de la miosina que une las cadenas ligeras (véase Fig. 13.25), que actúa como un brazo de palanca desplazando la cabeza de miosina aproximadamente 5 nm. Los productos de la hidrólisis (ADP y P_i) permanecen unidos a la cabeza de miosina, diciéndose que está en posición «ladeada». La cabeza de miosina se vuelve a unir al filamento de actina en

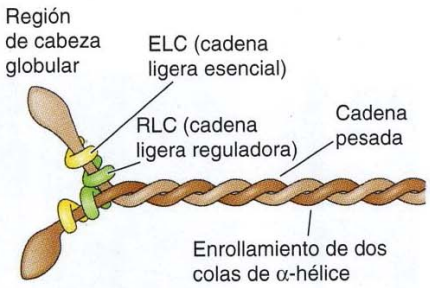


FIGURA 13.25 Miosina II. La molécula de miosina II consta de dos cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras (denominadas cadenas ligeras esenciales y reguladoras). Las cadenas pesadas tienen regiones de cabeza globular y colas largas en α-hélice, que se enrollan una alrededor de la otra para formar dímeros.

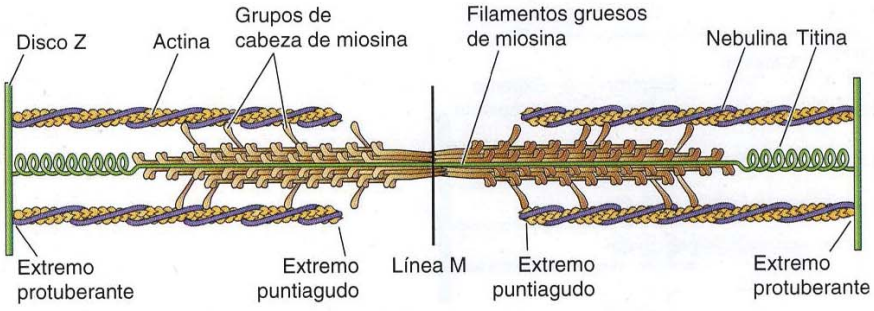


FIGURA 13.26 Organización de los filamentos gruesos de miosina. Los filamentos gruesos están constituidos por la asociación de varios cientos de moléculas de miosina II en una formación escalonada. Las cabezas globulares de la miosina se unen a la actina, formando puentes cruzados entre los filamentos de miosina y de actina. La orientación de los filamentos de actina y miosina se invierte en la línea M, de modo que su polaridad relativa es igual a ambos lados del sarcómero. Las moléculas de una molécula larga llamada titina se extienden del disco Z a la línea M, y sirven de muelles para mantener los filamentos de miosina centrados en el sarcómero. Las moléculas de otra proteína (nebulina) se extienden desde el disco Z en asociación con la actina y actúan para organizar y estabilizar los filamentos de actina.

ANIMACIÓN 13.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a13.2

Un filamento fino. Los filamentos finos del músculo esquelético consisten en filamentos de actina decorados con complejos de tropomiosina-troponina que cubren los sitios de unión a miosina.

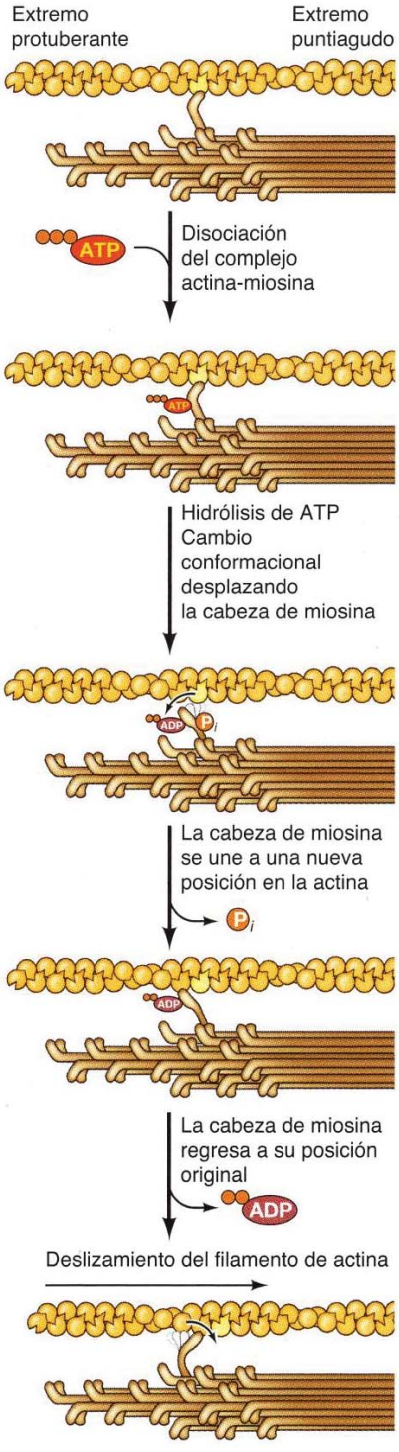


FIGURA 13.27 Modelo para la actuación de la miosina. La unión del ATP disocia la miosina de la actina. Entonces la hidrólisis de ATP induce un cambio conformacional que altera la posición del grupo de cabeza de la miosina. A esto le sigue la unión de la cabeza de miosina en una nueva posición sobre el filamento de actina y la liberación de P_i. La recuperación de la conformación inicial de la cabeza de miosina, junto a la liberación de ADP, induce el deslizamiento de los filamentos de actina.

una nueva posición, produciéndose la liberación de P_i, lo que induce el «golpe de potencia», a través del cual se libera ADP y la cabeza de miosina adopta de nuevo su conformación inicial, de modo que los filamentos de actina se deslizan hacia la línea M del sarcómero.

La contracción del músculo esquelético es disparada por impulsos nerviosos que estimulan la liberación de Ca^{2+} desde el **retículo sarcoplásmico** —una red especializada de membranas internas, similar al retículo endoplasmático, que almacena una elevada concentración de iones Ca^{2+}—. La liberación del Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico incrementa la concentración de Ca^{2+} en el citosol desde, aproximadamente, 10^{-7} a 10^{-5} *M*. El aumento de la concentración de Ca^{2+} es la señal para la contracción muscular, interviniendo dos proteínas accesorias unidas a los filamentos de actina: la tropomiosina y la **troponina** (**Fig. 13.28**). En el músculo estriado, cada molécula

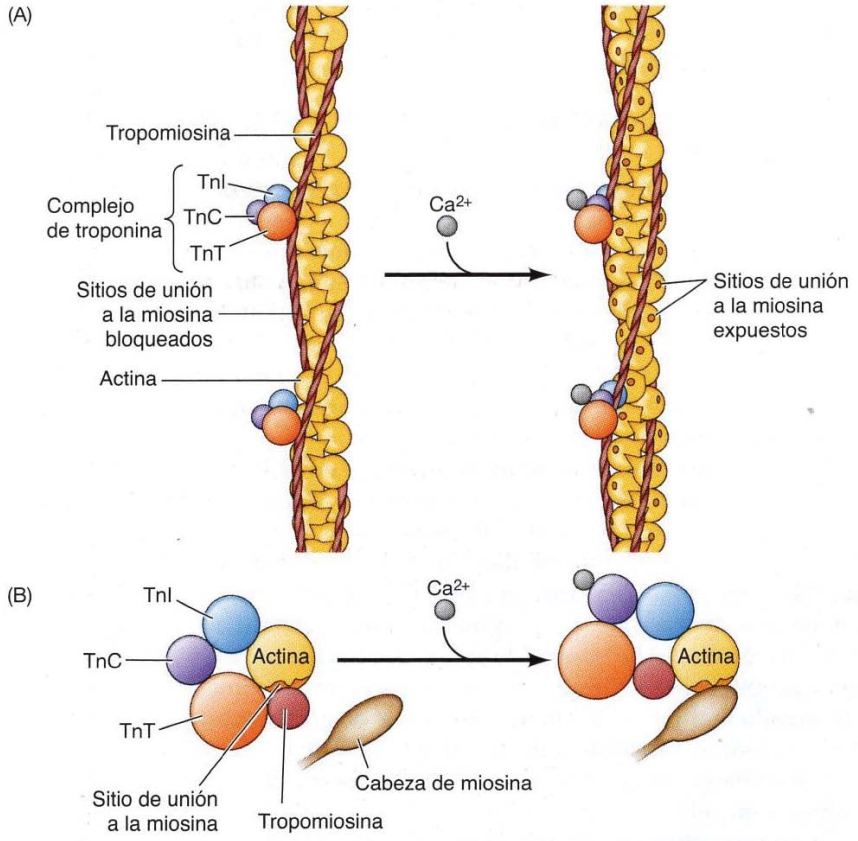


FIGURA 13.28 Asociación de la tropomiosina y troponinas a los filamentos de actina. (A) La tropomiosina se une longitudinalmente a lo largo de los filamentos de actina y, en el músculo estriado, se asocia con un complejo de tres troponinas: troponina I (TnI), troponina C (TnC) y troponina T (TnT). En ausencia de Ca^{2+}, el complejo de tropomiosina-troponina bloquea la fijación de la miosina a la actina. La unión del Ca^{2+} a la TnC altera la disposición del complejo, retirando la inhibición y permitiendo que la contracción tenga lugar. (B) Vista en sección transversal.

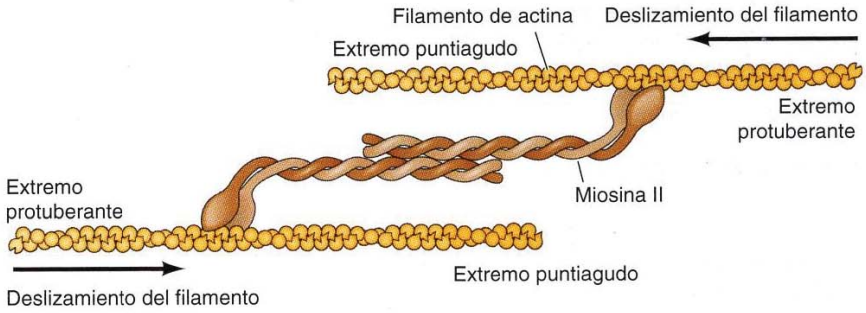


FIGURA 13.29 Asociaciones contráctiles en células no musculares. Los filamentos bipolares de miosina II producen la contracción deslizando los filamentos de actina en direcciones opuestas.

de tropomiosina se une a la troponina, la cual es un complejo de tres polipéptidos: troponina I (inhibitorio), troponina C (de unión a Ca^{2+}), y troponina T (de unión a la tropomiosina). Cuando la concentración de Ca^{2+} es baja, el complejo de las troponinas con la tropomiosina bloquea la interacción de casi todas las actinas con los grupos de las cabezas de miosina, por lo que el músculo no se contrae. A altas concentraciones, la unión del Ca^{2+} a la troponina C altera la disposición del complejo, permitiendo el acceso a las cabezas de miosina e incrementando el número de actinas y permitiendo que proceda la contracción.

Asociaciones contráctiles de actina y miosina en células no musculares

En las células no musculares también están presentes asociaciones contráctiles de actina y miosina, similares a versiones a pequeña escala de las fibras musculares. Al igual que en el músculo, los filamentos de actina en estos ensamblajes contráctiles están intercalados con filamentos bipolares de miosina II, constituidos por 15 a 20 moléculas de miosina II, los cuales producen la contracción deslizando los filamentos de actina uno sobre otro (**Fig. 13.29**). A diferencia de los filamentos de actina en el músculo estriado, los filamentos de actina/miosina en las células no musculares no están organizados en sarcómeros.

Dos ejemplos de asociaciones contráctiles en células no musculares, las fibras de estrés y los cinturones circunferencial, fueron tratados anteriormente al hablar de la unión del citoesqueleto de actina a regiones de contacto sustrato-célula y célula-célula (véanse Figs. 13.15 y 13.16). La contracción de las fibras de estrés genera tensión a lo largo de la célula, permitiendo a la célula tirar del sustrato (p. ej., la matriz extracelular) al que está anclada. La contracción de los cinturones de adhesión altera la forma de las capas de las células epiteliales: un proceso que es particularmente importante durante el desarrollo embrionario, cuando las capas de células epiteliales se pliegan para generar estructuras como pueden ser los tubos.

Sin embargo, el ejemplo más notorio de contracción mediada por actina-miosina en células no-musculares lo proporciona la **citocinesis** —la división de una célula en dos tras la mitosis (**Fig. 13.30**)—. Hacia el final de la mitosis en las células animales, un **anillo contráctil** formado por filamentos de actina y de miosina II se ensambla por acción de una miosina unida a la membrana justo debajo de la membrana plasmática. Al contraerse, tira progresivamente de la membrana plasmática hacia dentro, estrangulando la célula por el centro y dividiéndola en dos. El grosor del anillo contráctil permanece constante según se contrae, lo que implica que los filamentos de ac-

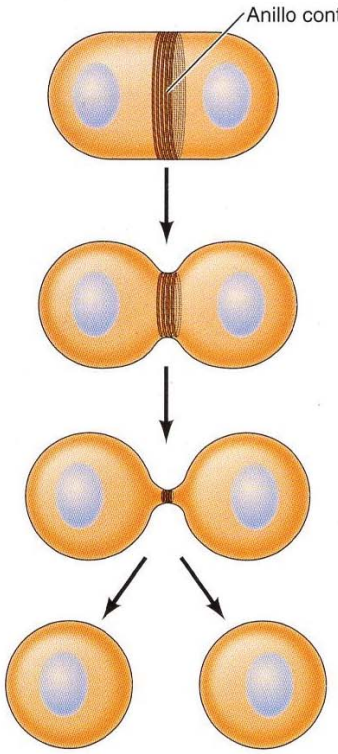


FIGURA 13.30 Citocinesis. Tras completarse la mitosis (división nuclear), un anillo contráctil formado por filamentos de actina y miosina II divide la célula en dos.

tina se desensamblan a medida que avanza la contracción. Tras la división celular el anillo se disgrega por completo. Sorprendentemente, aunque el mecanismo de división de las células vegetales es diferente (véase Cap. 15), la actina se ensambla en la posición de la división celular. La función de la actina parece ser muy antigua desde el punto de vista evolutivo puesto que una proteína bacteriana como la actina también interviene en la división celular. Sin embargo, se desconoce si la bacteria tiene miosina u otras proteínas motoras.

La regulación de la contracción por actina-miosina en el músculo estriado, vista anteriormente, tiene lugar mediante la unión de Ca^{2+} a la troponina. Sin embargo, en las células no musculares y en el músculo liso la contracción se regula principalmente por la fosforilación de una de las cadenas ligeras de la miosina II, la denominada cadena ligera reguladora (**Fig. 13.31**). La fosforilación de la cadena ligera reguladora en estas células tiene al menos dos efectos: promueve el ensamblaje de la miosina en filamentos, y aumenta la actividad catalítica de la miosina, permitiendo que la contracción tenga lugar. La enzima que cataliza esta fosforilación, denominada **quinasa de la cadena ligera de la miosina**, está regulada por la asociación con la proteína de unión de Ca^{2+} **calmodulina**. El aumento del Ca^{2+} citosólico promueve la unión de la calmodulina a la quinasa, lo que origina la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina. Por tanto, el incremento del Ca^{2+} citosólico es el responsable, aunque indirectamente, de la activación de la miosina en el músculo liso y en las células no musculares, así como en el músculo estriado.

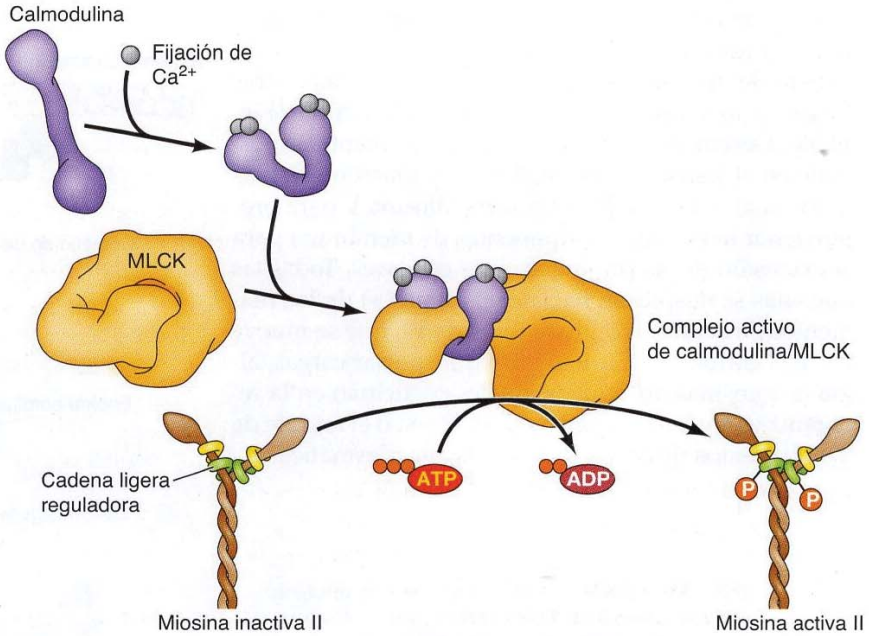


FIGURA 13.31 Regulación de la miosina por fosforilación. El Ca^{2+} se fija a la calmodulina, que a su vez se une a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). El complejo activo calmodulina-MCLK entonces fosforila la cadena ligera reguladora de la miosina II, lo que hace que la miosina pase de un estado inactivo a otro activo.

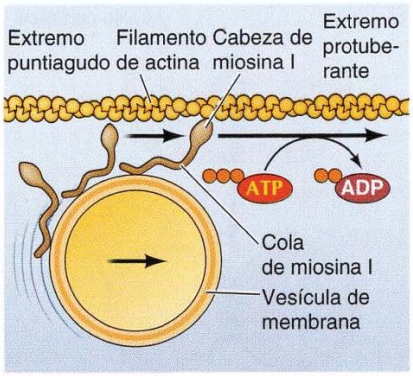


FIGURA 13.32 Miosina I. La miosina I contiene un grupo de cabeza que actúa como un motor impulsado por el ATP, similar a la miosina II, pero presenta una cola comparativamente pequeña y no forma dímeros ni filamentos. Aunque no puede inducir la contracción, la miosina I puede trasladarse a lo largo de los filamentos de actina (hacia el extremo protuberante) portando diversas cargas (como vesículas de membrana) unidas a su cola.

Miosinas no convencionales

Además de la miosina II (la miosina de dos cabezas presente primero en las células musculares), hay más de 20 tipos distintos de miosina en las células no musculares. Estas **miosinas no convencionales** no forman filamentos ni participan en la contracción. No obstante, sí son importantes en distintos movimientos celulares, como el transporte de vesículas de membrana, orgánulos, y otras cargas a lo largo de los filamentos de actina.

Un ejemplo de miosina no convencional es la **miosina I** (**Fig. 13.32**). Las proteínas de miosina I contienen un grupo globular que forma la cabeza que actúa como un motor molecular, como la de la miosina II, pero las proteínas de miosina I son moléculas mucho más pequeñas (aproximadamente unos 110 kDa en células de mamífero) que carecen de la larga cola de la miosina II. En lugar de formar dímeros, sus colas se unen a otras estructuras, como las vesículas de membrana o los orgánulos. El movimiento de la miosina I a lo largo de un filamento de actina puede entonces transportar la carga que lleve unida. Una función de la miosina I, vista anteriormente, es la formación de los brazos laterales que unen a los filamentos de actina con la membrana plasmática de las microvellosidades intestinales (véase Fig. 13.18). En estas estructuras, la actividad motora de la miosina I mueve la membrana plasmática a lo largo de los haces de actina hacia la punta de la microvellosidad. La miosina I podría intervenir también en el transporte de las vesículas y de los orgánulos a lo largo de los filamentos de actina y en el movimiento de la membrana plasmática durante la fagocitosis y la extensión de pseudópodos.

Otras miosinas no convencionales forman dímeros, como la miosina II. La miosina V, por ejemplo, es un dímero de dos cabezas que transporta vesículas y otras cargas a lo largo de los filamentos de actina (**Fig. 13.33**). Desempeña un cometido especialmente importante en el transporte de orgánulos y macromoléculas en las neuronas, donde se necesita miosina V para proporcionar los nuevos componentes de membrana para la extensión de las prolongaciones celulares. Todas las miosinas se desplazan hacia el extremo (+) de los filamentos de actina, excepto la miosina VI, que se mueve hacia el extremo (–). Además de transportar cargas, algunas miosinas no convencionales participan en la reorganización de los filamentos de actina o el anclaje de los filamentos de actina a la membrana plasmática.

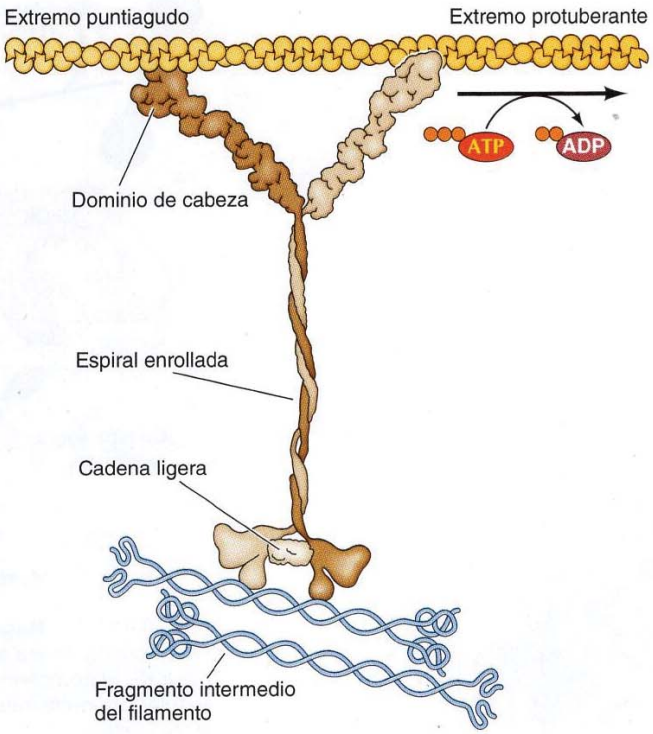


FIGURA 13.33 Miosina V. La miosina V es una miosina con dos cabezas como la II. Transporta orgánulos y otra mercancía (p. ej., filamentos intermedios) hacia los extremos protuberantes de los filamentos de actina, impulsado por la hidrólisis de ATP. El modelo que se muestra está basado en datos recientes obtenidos por cristalografía de rayos X. (R. D. Vale, 2003. *Cell* 112: 467.)

Microtúbulos

Los **microtúbulos**, el tercer componente principal del citoesqueleto, son varillas rígidas y huecas de aproximadamente 25 nm de diámetro. Al igual que los filamentos de actina, los microtúbulos son estructuras dinámicas que están continuamente ensamblándose y desensamblándose en la célula. Intervienen en la determinación de la forma celular y participa en diversos movimientos celulares, incluyendo algunas formas de locomoción celular, el transporte intracelular de orgánulos, y la separación de los cromosomas durante la mitosis.

Estructura y organización dinámica de los microtúbulos

Los microtúbulos están compuestos por un solo tipo de proteína globular denominada **tubulina**. La tubulina es un dímero constituido por dos polipéptidos de 55 kDa estrechamente relacionados, α-tubulina y β-tubulina. Al igual que en la actina, tanto la α-tubulina como la β-tubulina se codifican por pequeñas familias de genes relacionados (6 y 7 genes, respectivamente). Además, un tercer tipo de tubulina (γ-tubulina) se localiza específicamente en el centrosoma, donde desempeña un papel clave en el inicio del ensamblaje de los microtúbulos (como se verá después). El progenitor evolutivo de todas estas tubulinas parece ser una proteína similar a la proteína bacteriana, FtsZ, que forma una estructura en anillo por debajo de la membrana plasmática y dirige la síntesis de la pared de la célula bacteriana.

Al igual que la actina, la polimerización de tubulina puede estudiarse *in vitro*. Los dímeros de tubulina se polimerizan para formar microtúbulos, que consisten por lo general en 13 protofilamentos lineales ensamblados alrededor de un núcleo hueco (**Fig. 13.34**). Los protofilamentos, que están constituidos por un conjunto de dímeros de tubulina dispuestos cabeza con cola, se disponen en paralelo. Como consecuencia, los microtúbulos (al igual que los filamentos de actina) son estructuras polares con dos extremos diferenciados, referidos como extremos más y menos. Esta polaridad determina la dirección del movimiento motor molecular a lo largo de los microtúbulos, al igual que la polaridad de los filamentos de actina define la dirección del movimiento de la miosina.

Los microtúbulos son estructuras muy dinámicas que pueden sufrir ciclos de ensamblaje y desensamblaje rápidos. Tanto la α-tubulina como la β-tubulina se unen a GTP (véase Fig. 13.34), que actúa de forma análoga al ATP fijado a la actina para regular la polimerización. Concretamente, el GTP unido a la β-tubulina (pero no el unido a la α-tubulina) se hidroliza a

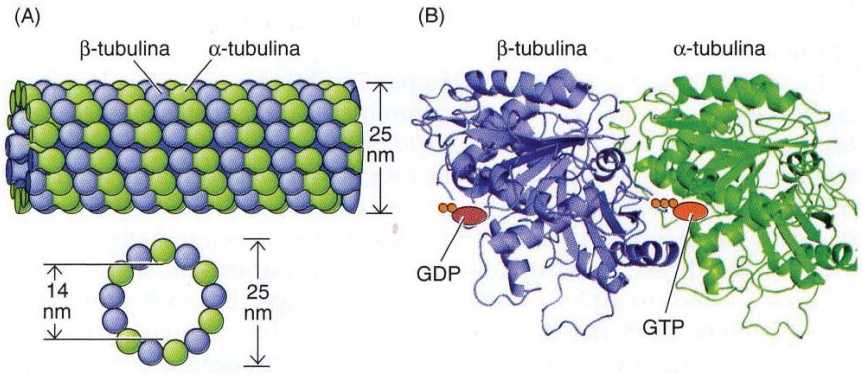


FIGURA 13.34 Estructura de los microtúbulos. (A) Los dímeros de α- y de β-tubulina polimerizan para formar microtúbulos, que están constituidos por 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un corazón hueco. (B) Estructura de un dímero de tubulina, con GTP unido a α-tubulina y GDP unido a β-tubulina.

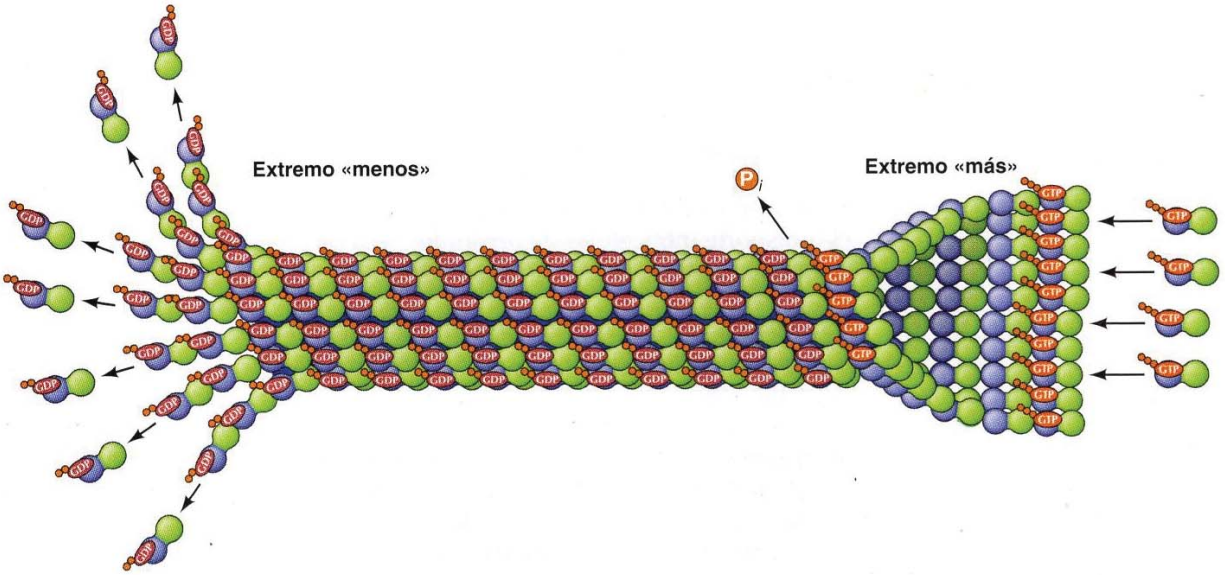


FIGURA 13.35 El papel del GTP en la polimerización de microtúbulos. Los dímeros de tubulina con GTP unidos a β-tubulina se asocian con los extremos «más» de crecimiento en una estructura plana, que después se cierra en un microtúbulo justo detrás de la región de crecimiento. Poco después de la polimerización, el GTP unido a la β-tubulina es hidrolizado en GDP. Puesto que la tubulina unida a GDP es menos estable en el microtúbulo, los dímeros del extremo «menos» empiezan a liberarse.

GDP inmediatamente después de la polimerización (**Fig. 13.35**). Esta hidrólisis de GTP debilita la afinidad de unión entre los dímeros de tubulina, que puede llevar a la rápida disociación de tubulina unida a GDP desde los extremos de los microtúbulos. En consecuencia, el extremo «menos» de los microtúbulos celulares debe ser protegido para evitar su despolimerización rápida, habitualmente por el anclaje de los extremos «menos» de los microtúbulos en el centro organizador de los microtúbulos o el centrosoma, como se describió anteriormente.

En los microtúbulos estabilizados por sus extremos «menos», la hidrólisis acelerada de GTP en el extremo «más» tiene como resultado un comportamiento conocido como **inestabilidad dinámica**, en la que los microtúbulos individuales alternan entre ciclos de crecimiento y acortamiento (denominados rescate y catástrofe) (**Fig. 13.36**). El que un microtúbulo crezca o se acorte viene determinado por la velocidad de adición de la tubulina respecto a la velocidad de hidrólisis del GTP. Mientras las nuevas moléculas de tubulina unidas a GTP se añadan a mayor velocidad que la de hidrólisis del GTP, el microtúbulo mantiene una caperuza de GTP en su extremo «más» y el crecimiento del microtúbulo continúa. Sin embargo, si la velocidad de polimerización decrece, el GTP fijado a la tubulina en el extremo «más» del microtúbulo será hidrolizado a GDP. Si esto ocurre, la tubulina unida a GDP se disociará, dando lugar a una rápida despolimerización y acortamiento del microtúbulo.

La inestabilidad dinámica, descrita por Tim Mitchison y Marc Kirschner en 1984, da lugar a una renovación continua y rápida de la mayor parte de los microtúbulos, que presentan una vida media en la célula de sólo varios minutos. Como se verá más adelante, esta rápida renovación de los microtúbulos es especialmente importante para el remodelado del citoesqueleto que tiene lugar durante la mitosis. Debido al papel central de los microtúbulos en la mitosis, los fármacos que afectan al ensamblaje de los microtúbulos no sólo son útiles como herramientas experimentales en biología celular sino también en el tratamiento del cáncer. La **colchicina** y la **colcemida** son ejemplos de fármacos experimentales empleados comúnmente que se unen a la tubulina e inhiben la polimerización del microtúbulo, bloqueando de esta forma la mitosis. Dos fármacos relacionados (**vincristina** y **vinblastina**) se usan en la quimioterapia del cáncer debido a que inhiben de forma selectiva a las células en rápida división. Otro fármaco utilizado, el

◆ El taxol fue originalmente aislado de la corteza de sauces del Pacífico. El sauce del Pacífico es uno de los árboles de crecimiento más lento y se necesitaron varios árboles para extraer suficiente taxol para tratar a un solo paciente, limitando la disponibilidad del fármaco. Afortunadamente, el taxol y sus derivados se producen ahora de forma económica vía un proceso semisintético en el que un compuesto similar al taxol es extraído de árboles relacionados y modificado químicamente.

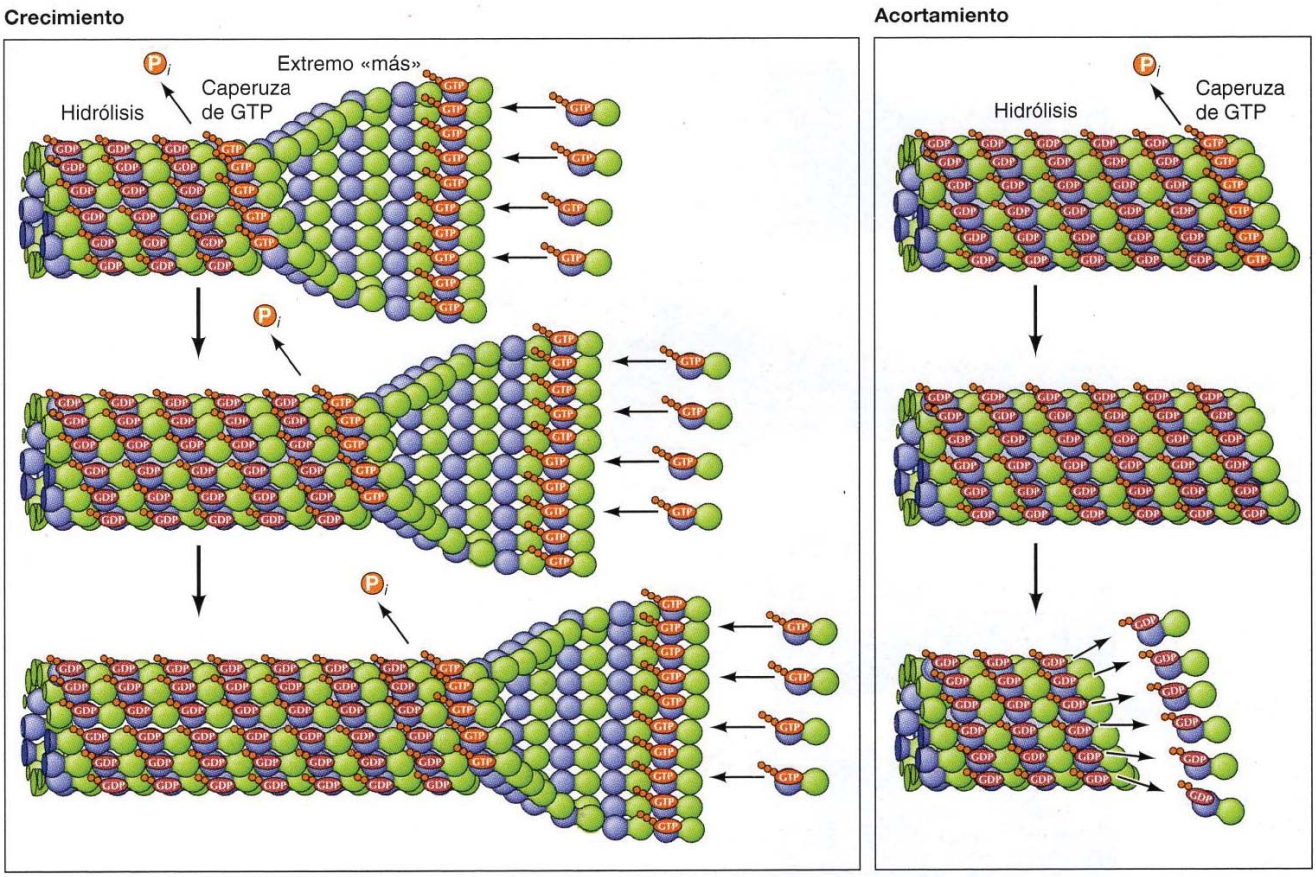


FIGURA 13.36 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La inestabilidad dinámica se debe a la hidrólisis del GTP unido a β-tubulina durante o justo después de la polimerización, que reduce la afinidad por las moléculas adyacentes. El crecimiento de los microtúbulos continúa mientras exista una concentración elevada de tubulina unida a GTP. En este caso las moléculas nuevas de tubulina unidas a GTP se añaden más rápido de lo que el GTP es hidrolizado, por lo que se mantiene una caperuza de GTP en el extremo en crecimiento. Sin embargo, si el GTP se hidroliza más rápidamente de lo que se añaden las nuevas subunidades, la presencia de tubulina unida a GDP en el extremo del microtúbulo lleva al desensamblaje y al acortamiento.

taxol, estabiliza los microtúbulos en vez de inhibir su ensamblaje. Dicha estabilización también bloquea la división celular, y el taxol se utiliza como agente anticanceroso y como herramienta experimental.

Las **proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP)** regulan el comportamiento dinámico de los microtúbulos celulares, del mismo modo que las proteínas unidas a la actina regulan la actividad de los filamentos de actina (**Tabla 13.2**). Como se describió, los extremos «menos» de los microtúbulos

ANIMACIÓN 13.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a13.3

Ensamblaje de microtúbulos. Los dímeros de tubulina pueden polimerizarse al igual que despolimerizarse para formar o deshacer microtúbulos.

TABLA 13.2 Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP)

Papel de la célula	Proteínas representativas
Inicio del microtúbulo	Anillo de tubulina-γ
Polimerización extremo más (+)	XMAP215
Despolimerización extremo más (+)	Quinesina 8 y 13
Corte	Katanin
Estabilidad longitudinal	Tau, MAP1, MAP2, MAP4
Rescate	CLASP

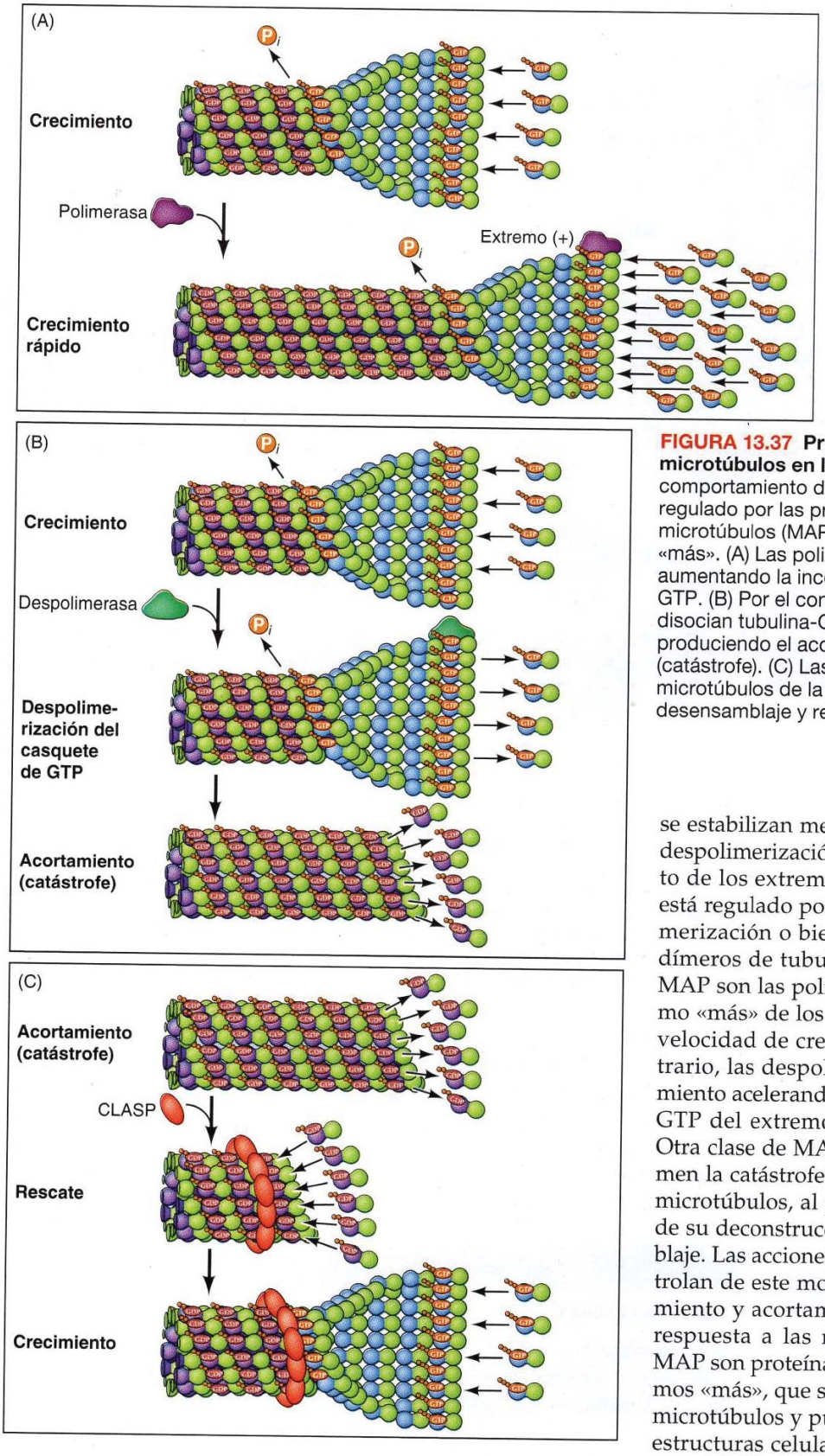


FIGURA 13.37 Proteínas asociadas a los microtúbulos en la inestabilidad dinámica. El comportamiento dinámico de los microtúbulos está regulado por las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP), que se unen a sus extremos «más». (A) Las polimerasas aceleran el crecimiento aumentando la incorporación de tubulina unida a GTP. (B) Por el contrario, las despolimerasas disocian tubulina-GTP del extremo «más», produciendo el acortamiento del microtúbulo (catástrofe). (C) Las proteínas CLASP rescatan a los microtúbulos de la catástrofe al detener su desensamblaje y reiniciar el crecimiento.

se estabilizan mediante proteínas que evitan su despolimerización. El crecimiento o acortamiento de los extremos «más» de los microtúbulos está regulado por MAP que promueven la polimerización o bien la despolimerización de los dímeros de tubulina (**Fig. 13.37**). Un grupo de MAP son las polimerasas, que se unen al extremo «más» de los microtúbulos y multiplican su velocidad de crecimiento por diez. Por el contrario, las despolimerasas estimulan el acortamiento acelerando la disociación de la tubulina-GTP del extremo «más» de los microtúbulos. Otra clase de MAP, las proteínas CLASP, suprimen la catástrofe y promueven el rescate de los microtúbulos, al parecer mediante la detención de su deconstrucción y el reinicio de su ensamblaje. Las acciones contrarias de estas MAP controlan de este modo la transición entre el crecimiento y acortamiento de los microtúbulos en respuesta a las necesidades celulares. Varias MAP son proteínas de seguimiento de los extremos «más», que se unen a estos extremos de los microtúbulos y pueden mediar su unión a otras estructuras celulares (como la membrana plasmática o el retículo endoplásmico), así como regular la dinámica de los microtúbulos.

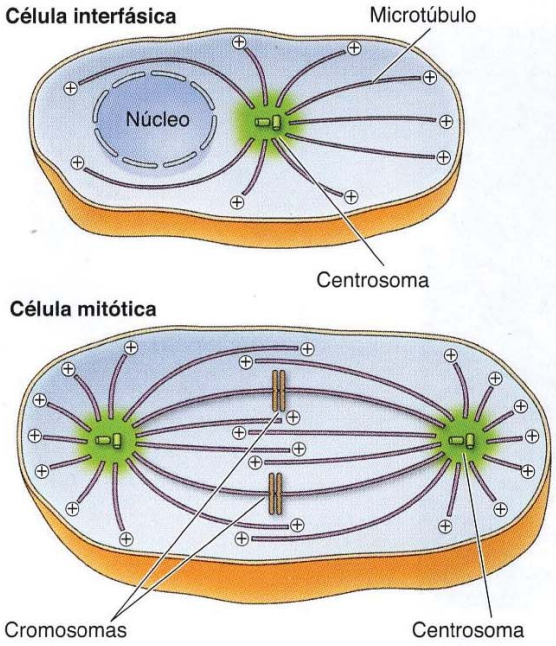


FIGURA 13.38 Organización intracelular de los microtúbulos. Los extremos «menos» de los microtúbulos se anclan al centrosoma. En las células interfásicas, el centrosoma se localiza cerca del núcleo y los microtúbulos se extienden hacia la periferia celular. Durante la mitosis los centrosomas duplicados se separan y los microtúbulos se reorganizan para formar el huso mitótico.

Ensamblaje de microtúbulos

En las células animales, la mayoría de los microtúbulos se extienden hacia fuera desde el **centrosoma** (descrito por primera vez por Theodor Boveri en 1888), que se localiza junto al núcleo cerca del centro de las células interfásicas (no están en división) (**Fig. 13.38**). Durante la mitosis, de forma similar, los microtúbulos se extienden a partir de centrosomas duplicados para formar el huso mitótico, que es responsable de la segregación y distribución de los cromosomas a las células hijas. El centrosoma desempeña así un papel fundamental como centro de **organización de microtúbulos** en la determinación de la distribución intracelular de microtúbulos en células animales. En los hongos, los cuerpos de los polos del huso actúan de forma semejante a los centrosomas. Sin embargo, las células vegetales carecen de un centrosoma organizado o de cualquier otra forma de centro de organización de microtúbulos. En su lugar, los microtúbulos de la mayor parte de las plantas se dispersan y forman una matriz subyacente a la membrana plasmática, donde asumen un cometido central para guiar la síntesis de las paredes de las células vegetales (como se indica en el Capítulo 15).

El centrosoma actúa como el lugar de inicio para el ensamblaje de microtúbulos en células animales, que después crecen hacia la periferia de la célula con sus extremos menos anclados en el centrosoma. Esto se puede observar claramente en células que hayan sido tratadas con colcemida para desensamblar sus microtúbulos (**Fig. 13.39**). Cuando el fármaco se retira, las células se recuperan y pueden verse nuevos microtúbulos creciendo desde el centrosoma. Es impor-

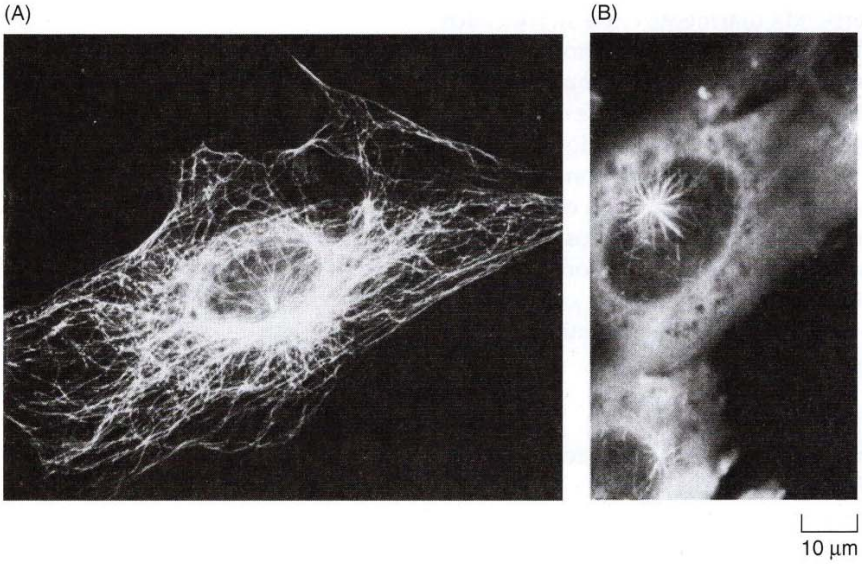


FIGURA 13.39 Crecimiento de los microtúbulos desde el centrosoma. Los microtúbulos en los fibroblastos de ratón se observan mediante microscopia de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo frente a tubulina. (A) La distribución de los microtúbulos en una célula interfásica normal. (B) Esta célula se trató con colcemida durante una hora para desensamblar los microtúbulos. El fármaco fue entonces retirado y se dejó a la célula recuperarse durante treinta minutos, lo que permitió ver nuevos microtúbulos creciendo desde el centrosoma. (De M. Osborn y K. Weber, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:867.)

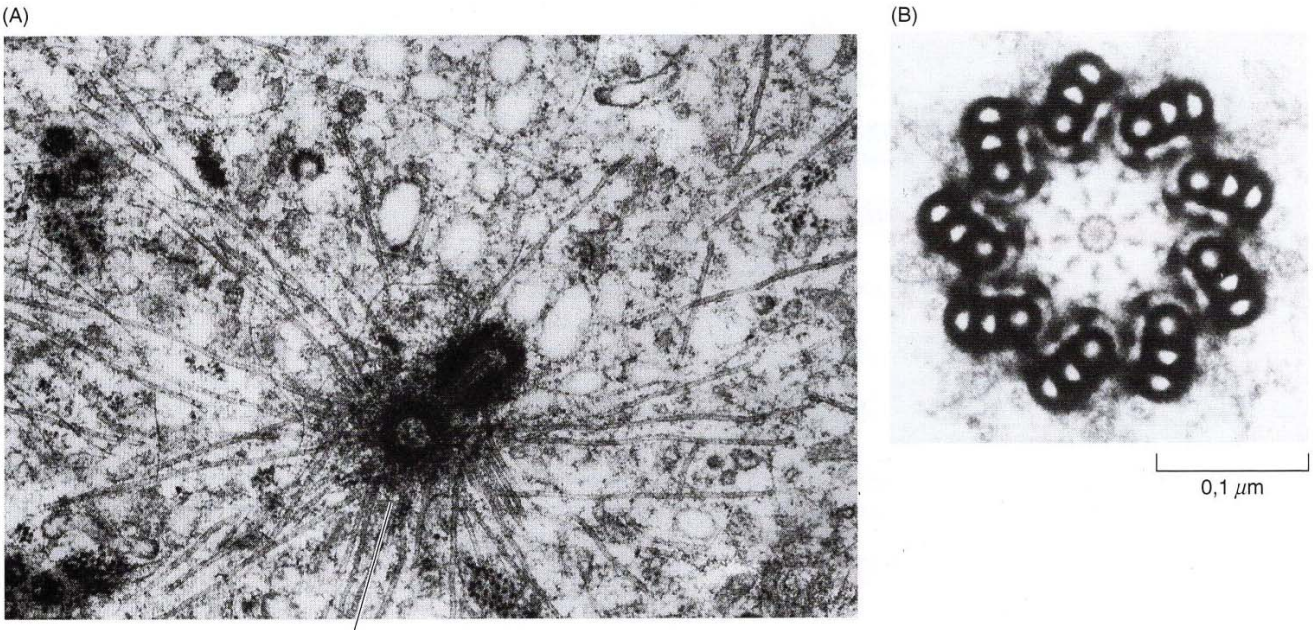


FIGURA 13.40 Estructura de los centrosomas. (A) Micrografía electrónica de un centrosoma, mostrando los microtúbulos irradiando desde el material pericentriolar que rodea al par de centríolos. (B) Sección transversal de un centríolo mostrando sus nueve tripletes de microtúbulos.

tante señalar que el inicio del crecimiento de los microtúbulos en el centrosoma establece la polaridad de los microtúbulos en la célula. Concretamente, los microtúbulos crecen por la adición de tubulina a sus extremos «más», que se extienden desde el centrosoma hacia la periferia celular, de modo que el papel del centrosoma es *iniciar* el crecimiento de los microtúbulos. La proteína clave en el centrosoma es la γ-tubulina, una forma minoritaria de tubulina identificada por primera vez en hongos, que nuclea el ensamblaje de microtúbulos. La γ-tubulina está asociada con ocho o más proteínas diferentes con una estructura en forma de anillo denominado **complejo del anillo de γ-tubulina**. Se cree que actúa como una semilla para el crecimiento rápido de microtúbulos, evitando el paso limitante de la nucleación.

Los centrosomas de la mayoría de las células animales están constituidos por un par de **centríolos**, orientados perpendicularmente entre sí, rodeados por un **material pericentriolar** amorfo (**Fig. 13.40**). Los centríolos son estructuras cilíndricas que contienen nueve tripletes de microtúbulos organizados alrededor de una estructura central en forma de rueda de carro. También actúan en la superficie celular como cuerpos basales de cilios y flagelos (descrito más adelante). Sin embargo, aunque los centríolos son necesarios para formar los cilios y flagelos, no son precisos para la función organizadora de microtúbulos del centrosoma, y están ausentes en muchos eucariotas unicelulares, y la mayoría de las células animales en meiosis (como los óvulos de ratón). Es el material pericentriolar, y no los centríolos, contiene los anillos de γ-tubulina y actúa para iniciar el ensamblaje de los microtúbulos y ancla los extremos «menos» de los mismos.

Organización de los microtúbulos en las células

Como describimos previamente, el comportamiento de los microtúbulos de una célula está regulado por las MAP (véase Tabla 13.2). Muchas MAP controlan la inestabilidad dinámica uniéndose a los extremos «más» de los microtúbulos, pero otras los destruyen o bien los estabilizan uniéndose a lo

largo de su extensión. La estabilidad de los microtúbulos también está regulada por grandes modificaciones postraducción de la tubulina. Tanto la α-tubulina como la β-tubulina pueden modificarse por fosforilación, acetilación, palmitoilación, eliminación y adición posterior de tirosinas en el extremo carboxiterminal, y adición de múltiples glutaminas o glicinas. Estas modificaciones postraducción influyen en el comportamiento de los microtúbulos al aportar lugares de unión para MAP específicas.

Las interacciones con las MAP permiten que la célula estabilice sus microtúbulos en localizaciones concretas y suponen un mecanismo importante para determinar la forma y polaridad celular. Muchas MAP son específicas de un tipo celular. Algunas de las primeras MAP identificadas fueron MAP1, MAP2, y *tau* (aislada en neuronas), y MAP4, presente en todos los tipos celulares distintos de neuronas en los vertebrados. La proteína *tau* se ha estudiado en profundidad porque es el componente principal de las lesiones características encontradas en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (ver el apartado de medicina nuclear en el Cap. 9).

Un buen ejemplo de la asociación entre microtúbulos estables y polaridad celular son las neuronas, con sus dos tipos de prolongaciones distintas (axones y dendritas) que salen del cuerpo celular (**Fig. 13.41**). Tanto los axones como las dendritas, unido a los neurofilamentos se comentará en la siguiente sección de este capítulo. Sin embargo, los microtúbulos de las células nerviosas no están anclados al centrosoma. En su lugar, se liberan desde el centrosoma y sus extremos más y menos terminan en el citoplasma, estabilizado por proteínas de caperuza. Por otra parte, los microtúbulos se organizan en distintos MAP en axones y dendritas. En los axones, todos los microtúbulos están orientados con sus extremos positivos hacia el exterior celular, de forma similar a la orientación de los microtúbulos en otros tipos celulares. En las dendritas, los microtúbulos están orientados en ambas direcciones; algunos extremos positivos se dirigen hacia el cuerpo celular y algunos se dirigen hacia la periferia celular. Estas disposiciones concretas de microtúbulos están acompañadas por diferencias en las MAP: Los axones contienen proteínas *tau*, pero no MAP-2, mientras que las den-

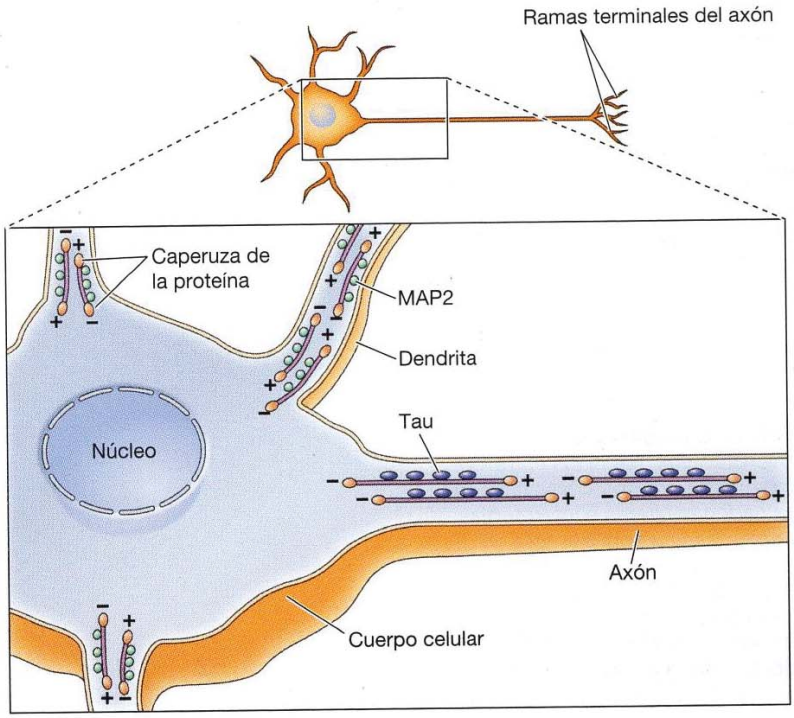


FIGURA 13.41 Organización de los microtúbulos en las células nerviosas. Dos tipos distintos de prolongaciones se extienden desde el cuerpo celular de las células nerviosas (neuronas). Las dendritas son prolongaciones cortas que reciben estímulos de otras células nerviosas. El único axón largo transmite impulsos desde el cuerpo celular a otras células, que pueden ser bien otras neuronas o bien células efectoras, tales como el músculo. Los microtúbulos estables tanto en los axones como en las dendritas terminan en el citoplasma en vez de unirse al centrosoma. En las dendritas, los microtúbulos se orientan en ambas direcciones, con sus extremos «más» apuntando tanto hacia el cuerpo celular como hacia el sentido contrario. Por el contrario, todos los microtúbulos de los axones se orientan con sus extremos «más» apuntando hacia el final del axón. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) cubren tanto los extremos «más» como los «menos» y estabilizan los microtúbulos fijándose a ellos a lo largo de toda su longitud (la MAP2 en dendritas y la *tau* en axones).

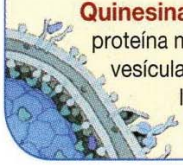
dritas contienen MAP-2, pero no proteínas *tau*, y parece que estas diferencias en la distribución de MAP-2 y *tau* son responsables de la distinta organización de los microtúbulos estables de axones y dendritas.

Motores microtubulares y movimientos

Los microtúbulos son responsables de diversos movimientos celulares, incluyendo el transporte intracelular y el posicionamiento de las vesículas de membrana y de los orgánulos, la separación de los cromosomas en la mitosis y el batir de los cilios y flagelos. Como se vio anteriormente para los filamentos de actina en este capítulo, tiene lugar a través de dos vías: la polimerización y la despolimerización de los microtúbulos se basa en la acción de proteínas motoras que utilizan energía derivada de la hidrólisis de ATP para producir fuerza y movimiento. Los miembros de dos grandes familias de proteínas motoras —las **quinesinas** y las **dineínas**— son los responsables de impulsar los diversos movimientos en los que participan los microtúbulos.

ANIMACIÓN 13.4

sites.sinauer.com/cooper7e/a13.4



Quinesina. La quinesina es una proteína motora que desplaza vesículas y orgánulos hacia los extremos positivos de los microtúbulos.

Proteínas motoras microtubulares

La dineína y la quinesina, los dos tipos de proteínas motoras de los microtúbulos, se mueven a lo largo de los microtúbulos en direcciones opuestas —la mayor parte de las dineínas hacia el extremo menos y las quinesinas hacia el extremo más (**Fig. 13.42**)—. La primera de estas proteínas motoras microtubulares que se identificó fue la dineína, que la aisló Ian Gibbons en 1965. La

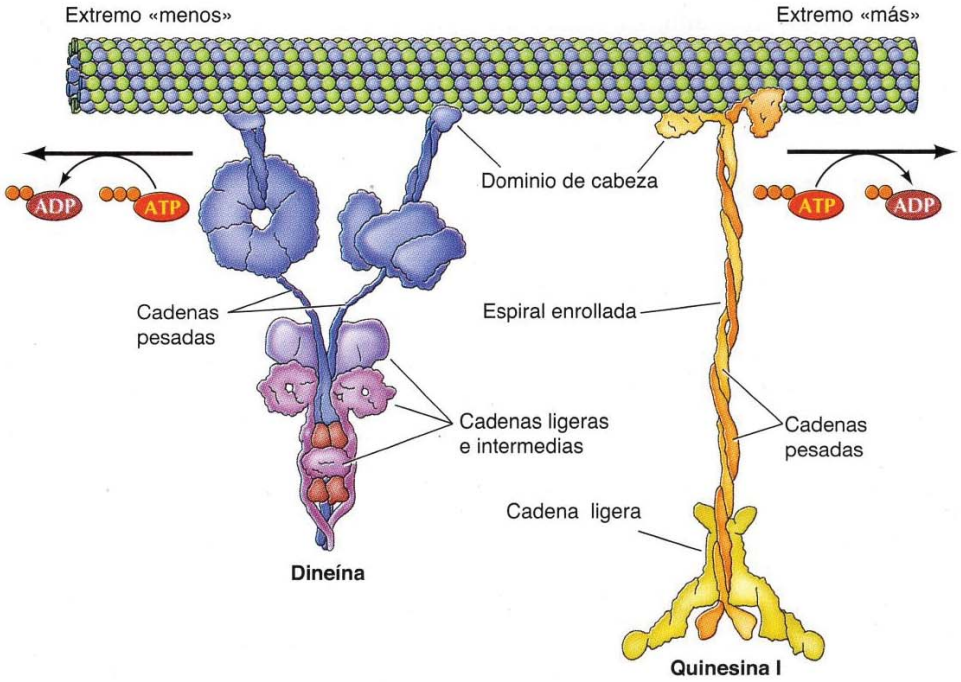
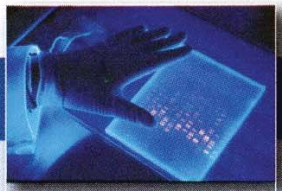


FIGURA 13.42 Proteínas motoras microtubulares. La quinesina y la dineína migran en direcciones opuestas a lo largo de los microtúbulos, hacia los extremos menos y más, respectivamente. La dineína está constituida por dos o tres cadenas pesadas (aquí se muestran dos) asociadas a varias cadenas ligeras e intermedias. La quinesina I consta de dos cadenas pesadas, enrolladas una sobre la otra en una estructura de hélice enrollada, y de dos cadenas ligeras. Los dominios de cabeza globular de las cadenas pesadas se fijan a los microtúbulos y son los dominios motores de la molécula. Los dominios de cabeza globular de las cadenas pesadas son los dominios motores. Los modelos mostrados están basados en datos recientes obtenidos por cristalografía de rayos X. (R. D. Vale, 2003. *Cell* 112:467.)



EXPERIMENTO CLAVE

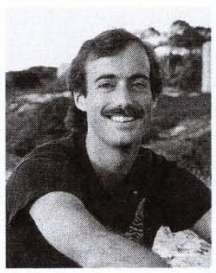
Aislamiento de la quinesina

Identificación de una nueva proteína generadora de fuerza, la quinesina, implicada en la movilidad basada en microtúbulos

Ronald D. Vale, Thomas S. Reese y Michael P. Sheetz

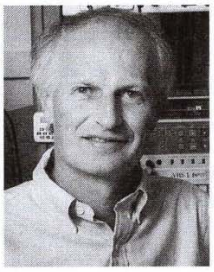
National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, Narine Biological Laboratory, Woods Hole, MA; University of Connecticut Health Center, Farmington, CT; Stanford University School of Medicine, Stanford, CA

Cell, Volumen 42, 1985, págs. 39-50



R. D. Vale

T. S. Reese



M. P. Sheetz

Contexto

El transporte y posicionamiento de los orgánulos citoplasmáticos es un hecho clave en la organización de las células eucariotas, por lo que comprender los mecanismos responsables del transporte de las vesículas y orgánulos es una cuestión fundamental en biología celular. En 1982, Robert Allen, Scott Brady, Ray Lasek y sus colaboradores emplearon la microscopia amplificada por vídeo para visualizar el movimiento de los orgánulos a lo largo de los filamentos citoplasmáticos en los axones gigantes de calamar, tanto *in vivo* como en un sistema de libre de células. Estos filamentos se identificaron como microtúbulos mediante microscopia electrónica, pero se desconocían las proteínas motoras responsables del movimiento de los orgánulos: el único motor microtubular identificado hasta ese momento era la dineína axonémica, que estaba presente solamente en cilios y flagelos. En 1985, Ronald Vale, Thomas Reese y Michael Sheetz describieron el aislamiento de una proteína motora nueva, la quinesina, que era responsable del movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos. Experimentos similares fueron publicados a la vez por Scott Brady (*Nature*, 1985, 317: 73-75).

Experimentos

Dos estrategias experimentales fueron determinantes para el aislamiento de la quinesina. La primera, basada en el trabajo de Allen y sus colaboradores, era el uso de un sistema *in vitro* en el que se podía detectar la actividad de la proteína motora. Vale, Reese y Sheetz utilizaron un sistema en el que proteínas del citoplasma de los axones impulsaban el movimiento de los microtúbulos a través de la superficie de una platina de cristal. Estos sistemas libres de células proporcionaron un método sensible y funcional para analizar la actividad de la quinesina como un motor molecular.

La segunda estrategia importante empleada en el aislamiento de la quinesina fue aprovechar su capacidad de unión a los microtúbulos. Lasek y Brady (*Nature*, 1985, 316: 645-647) habían observado que los movimientos *in vitro* de los microtúbulos requerían ATP y eran inhibidos por un análogo de ATP (adenilil imidodifosfato, AMP-PNP) que no puede ser hidrolizado y de esta manera no proporciona una fuente de energía útil. En presencia de AMP-PNP los orgánulos permanecían unidos a los microtúbulos, lo que sugería que la proteína motora responsable del movimiento de los orgánulos podría también permanecer unida a los microtúbulos bajo estas condiciones.

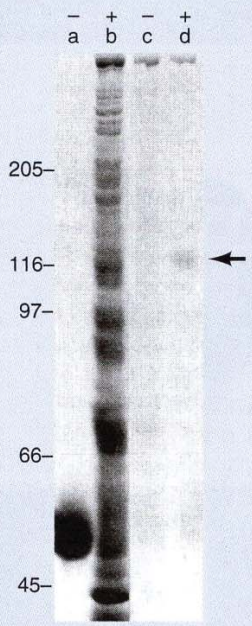
A partir de estos descubrimientos, Vale y sus colaboradores incubaron microtúbulos con proteínas citoplasmáticas de axón de calamar en presencia de AMP-PNP. Los microtúbulos se recuperaron e incubaron con ATP para liberar las proteínas que estaban unidas específicamente en presencia del análogo de ATP no hidrolizable. En este experimento se identificó un polipéptido de 110 kDa que se fijaba a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP y que se liberaba tras la incubación con ATP (véase figura). Además, las proteínas unidas a los microtúbulos y después liberadas por ATP también mantenían el movimiento de los microtúbulos *in vitro*. Por tanto, la unión a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP proporcionó un abordaje eficaz para aislar la proteína motora, que se mostró por estudios bioquímicos posteriores que contenía el polipéptido de 110 kDa unido a polipéptidos de 60 a 70 kDa. Mediante un abordaje similar, también se purificó una proteína relacionada a partir de cerebro de bovino. Los autores concluyeron que estas proteínas «representan una nueva clase de proteínas motoras que son estructuralmente así como enzimáticamente distintas de la dineína, y proponemos denominar a estos translocadores quinesina (del griego *kinein*, moverse)».

Impacto

El movimiento de las vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos es fundamental para la organización de las células eucariotas, por lo que las proteínas motoras

(Continúa en página siguiente)

EXPERIMENTO CLAVE



Fijación de una proteína motora a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP. Se analizaron muestras de proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida, que se tiñó y fotografió. El peso molecular de las proteínas marcadoras se indica a la izquierda en kilodaltons. La columna «a» representa microtúbulos purificados, en la que sólo se detecta tubulina (55 kDa). La columna «b» es un extracto soluble de citoplasma de axón de calamar, conteniendo muchos polipéptidos diferentes. Se incubó este extracto soluble con microtúbulos tanto sin AMP-PNP (columna *c*) como con él (columna *d*). Se recuperaron los microtúbulos y se incubaron con ATP para liberar las proteínas fijadas, las cuales fueron sometidas a electroforesis. Nótese que un polipéptido de 110 kDa estaba unido específicamente a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP y después se liberó por ATP. También se encontró que las proteínas unidas en presencia de AMP-PNP y liberadas por ATP inducían el movimiento de los microtúbulos (indicado por «+» sobre el gel).

responsables de estos movimientos desempeñan un papel crítico en la biología celular. Experimentos posteriores empleando modelos *in vitro* similares a los descritos aquí establecieron que la quinesina se desplaza a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo «más», mientras que la dineína citoplasmática es la responsable del transporte de vesículas y orgánulos en la dirección del extremo «menos» de los microtúbulos. Más aún, desde entonces se ha identificado una gran familia de proteínas relacionadas con la quinesina. Además de su papel en el transporte de las vesículas y orgánulos, los miembros de estas familias de proteínas motoras son responsables de la separación y distribución de los cromosomas durante la mitosis. Por tanto, la identificación de la quinesina abrió la puerta para comprender diversos movimientos basados en los microtúbulos que resultan claves para la estructura y función de las células eucariotas.

purificación de esta forma de dineína (denominada **dineína axonémica**) se vio facilitada porque es una proteína muy abundante en los cilios, al igual que la abundancia de miosina facilitó que se aislara a partir de las células musculares. Sin embargo, costó más identificar otros motores microtubulares debido a que las proteínas responsables de procesos como el movimiento de los cromosomas y el transporte de los orgánulos se presentan a concentraciones relativamente bajas en el citoplasma. El aislamiento de estas proteínas dependió del desarrollo de nuevos métodos experimentales para detectar la actividad de los motores moleculares en medios libres de células.

El desarrollo de los ensayos *in vitro* para las proteínas motoras citoplasmáticas se basó en la utilización de la **microscopia vídeo-amplificada**, desarrollada por Robert Allen y Shinya Inoué a principios de los años 80, para estudiar el movimiento de las vesículas de membrana y de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos en los axones de calamar. En este método se utiliza una cámara de vídeo para aumentar el contraste de las imágenes obtenidas con un microscopio óptico, lo que mejora sustancialmente la detección de objetos pequeños y permite que se pueda seguir el movimiento de los orgánulos en las células vivas. Utilizando este abordaje, Allen, Scott Brady y Ray Lasek demostraron que el movimiento de los orgánulos también puede tener lugar en un sistema libre de células en el que se haya retirado la membrana plasmática y se haya extendido un extracto citoplasmático en una platina de cristal. Estas observaciones condujeron al desarrollo de un sistema reconstruido *in vitro*, que proporcionó un método capaz de detectar proteínas celulares responsables del movimiento de los orgánulos. En 1985 Brady, junto con Ronald Vale, Thomas Reese y Michael Sheetz, se basaron en estas innovaciones para identificar la quinesina (conocida actualmente como quinesina «convencional» o quinesina I) como una nueva pro-

teína motora de los microtúbulos, presente tanto en los axones de sepia como en el cerebro bovino.

Estudios posteriores demostraron que la quinesina I se desplaza a lo largo de los microtúbulos en una única dirección —hacia el extremo «más»—. Debido a que los extremos «más» de los microtúbulos en los axones están todos orientados hacia fuera del cuerpo celular (véase Fig. 13.41), el movimiento de la quinesina en esta dirección transporta las vesículas y orgánulos hacia fuera del cuerpo celular, hacia el final del axón. Sin embargo, en axones intactos también se ha observado que las vesículas y orgánulos migran hacia el interior del cuerpo celular, lo que implica que una proteína motora distinta podría ser la responsable del movimiento a lo largo de los microtúbulos en la dirección opuesta —hacia el extremo «menos»—. En concordancia con esta predicción, otros experimentos mostraron que una proteína asociada a los microtúbulos ya identificada, relacionada con la dineína aislada en los cilios (dineína axonémica), era realmente la proteína motora que se desplazaba por los microtúbulos hacia el extremo «menos». Actualmente se la conoce como **dineína citoplásmica**.

La quinesina I es una molécula de aproximadamente 380 kDa, constituida por dos cadenas pesadas (120 kDa cada una) y dos cadenas ligeras (de 64 kDa cada una) (véase Fig. 13.42). Las cadenas pesadas tienen regiones largas de α-hélice que se enrollan una alrededor de la otra en una estructura de hélice enrollada. Los dominios de cabeza globular amino-terminales de las cadenas pesadas son los dominios motores de la molécula: se unen tanto a los microtúbulos como al ATP, cuya hidrólisis proporciona la energía necesaria para el movimiento. Aunque el dominio motor de la quinesina (aproximadamente 340 aminoácidos) es mucho más pequeño que el de la miosina (alrededor de 850 aminoácidos), la cristalografía por rayos X indica que la quinesina y la miosina están relacionadas estructuralmente y comparten un mecanismo molecular semejante para generar fuerza y movimiento. La zona de la cola de la molécula de quinesina está constituida por las cadenas ligeras unidas a los dominios carboxilo-terminales de las cadenas pesadas. Esta región de la quinesina es la responsable de la unión a otros componentes celulares (como vesículas de membrana y orgánulos) que se transportan a lo largo de los microtúbulos por la acción de los motores de quinesina.

Al igual que las miosinas, las quinesinas conforman una familia de proteínas motoras relacionadas. El genoma de *C. elegans* codifica 45 quinesinas diferentes y hay cuarenta y cinco quinesinas conocidas en el ser humano. La mayoría de éstas, como quinesina I, se mueven a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo positivo. Otras quinesinas se mueven en dirección contraria, hacia el extremo «menos», y algunas quinesinas no se desplazan a lo largo del microtúbulo sino que funcionan como enzimas despolimerizadoras de microtúbulos. Existe una correlación directa entre dónde se encuentra el dominio motor en la molécula y la dirección del movimiento a lo largo del microtúbulo; las quinesinas que se dirigen al extremo positivo poseen dominios motores N-terminales, las quinesinas que se dirigen al extremo negativo poseen dominios motores C-terminales, y aquellas que no se desplazan a lo largo de los microtúbulos poseen dominios motores en el centro de la cadena pesada (quinesinas de motor céntrico). Los distintos miembros de la familia quinesina varían en las secuencias de sus colas carboxilo-terminales y son responsables de los movimientos de diferentes tipos de «mercancías» sobre los microtúbulos.

Existen varios tipos de dineínas de axonemas, que alimentan el batido de los cilios, y al menos dos tipos de dineínas citoplásmicas, responsables del movimiento de la mayor parte de la carga hacia los extremos menos de los microtúbulos. La dineína citoplásmica es una molécula extremadamente

grande (hasta 2.000 kDa), que consiste en dos o tres cadenas pesadas (cada una de unos 500 kDa) en complejo con un número variable de cadenas ligeras e intermedias, que están comprendidas entre 14 y 120 kDa (véase Fig. 13.42). Como en la quinesina, las cadenas pesadas de dineína forman dominios motores de unión a ATP globulares que son responsables del movimiento de lo largo de los microtúbulos. Sin embargo, los dominios motores de dineína no están relacionados con los de miosina y quinesina, y el mecanismo molecular de la acción de la dineína como motor molecular se conoce bastante menos. La parte basal de dineína citoplásmica, incluidas las cadenas ligeras e intermedias, se une a otras estructuras subcelulares, como los orgánulos y las vesículas. Existen varios tipos de cadenas ligeras e intermedias, que transportan distintas cargas. Según se piensa, las dineínas y quinesinas específicas también reconocen diferentes microtúbulos por modificaciones postraduccionales de la tubulina.

VÍDEO 13.4

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.4

Movimiento de las vesículas a lo largo de microtúbulos. Las vesículas son transportadas a través del citoplasma a lo largo de microtúbulos por la quinesina y la dineína.

Transporte de mercancías y organización intracelular

Una de las funciones principales de los microtúbulos, como los filamentos de actina, es transportar macromoléculas, vesículas de membrana y orgánulos a través del citoplasma de las células eucariotas. Como ya se ha visto, dicho transporte de orgánulos citoplasmáticos resulta evidente en los axones de las células nerviosas, que pueden extenderse más de un metro de longitud. Los orgánulos y las vesículas de membrana que contienen proteínas y ARN tienen que ser transportadas del cuerpo celular al axón. Utilizando la microscopia amplificada por vídeo se puede visualizar el transporte de las vesículas de membrana y de los orgánulos en ambas direcciones a lo largo de los microtúbulos de los axones, donde la quinesina y la dineína llevan sus cargas hasta y desde los extremos de los axones, respectivamente. Por ejemplo, las vesículas secretoras que contienen neurotransmisores se transportan desde el aparato de Golgi hasta las ramas terminales del axón por la quinesina. En la dirección opuesta, la dineína citoplasmática transporta vesículas endocíticas desde el axón hacia el cuerpo celular.

En otros tipos de células los microtúbulos transportan macromoléculas, vesículas de membrana y orgánulos de forma similar. Debido a que los microtúbulos están generalmente orientados con sus extremos «menos» unidos al centrosoma y sus extremos «más» extendiéndose hacia la periferia celular, se piensa que los diferentes miembros de las familias de quinesina y dineína citoplasmática transportan mercancía, las vesículas y los orgánulos en direcciones opuestas a través del citoplasma (**Fig. 13.43**). La quinesina I y otros miembros de la familia de la quinesina que se dirigen hacia el extremo «más», transportan su carga hacia la periferia celular, mientras que las dineínas citoplasmáticas y los miembros de la familia de la quinesina que se dirigen hacia el extremo «menos» transportan los materiales hacia el centro

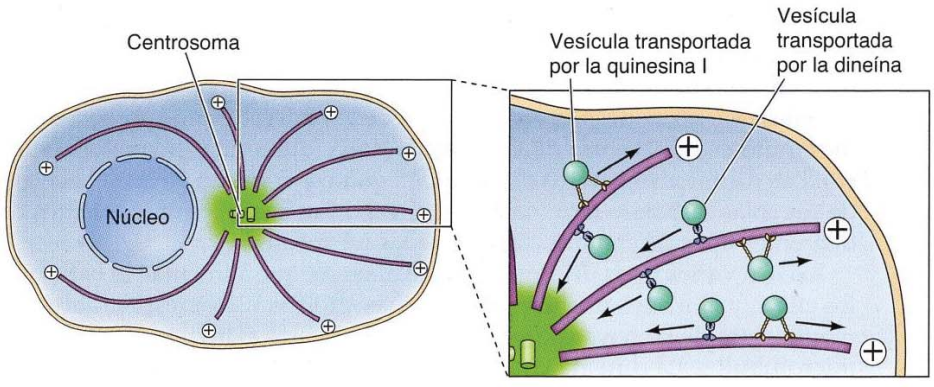


FIGURA 13.43 Transporte de las vesículas a lo largo de los microtúbulos. La quinesina I y otros miembros de la familia de la quinesina dirigidos hacia el extremo «más», transportan vesículas y orgánulos en dirección a los extremos «más» de los microtúbulos, que se extienden hacia la periferia celular. Por el contrario, la dineína y los miembros de la familia de la quinesina dirigidos al extremo «menos», transportan sus cargas en dirección a los extremos «menos» de los microtúbulos, que se encuentran unidos en el centro de la célula.

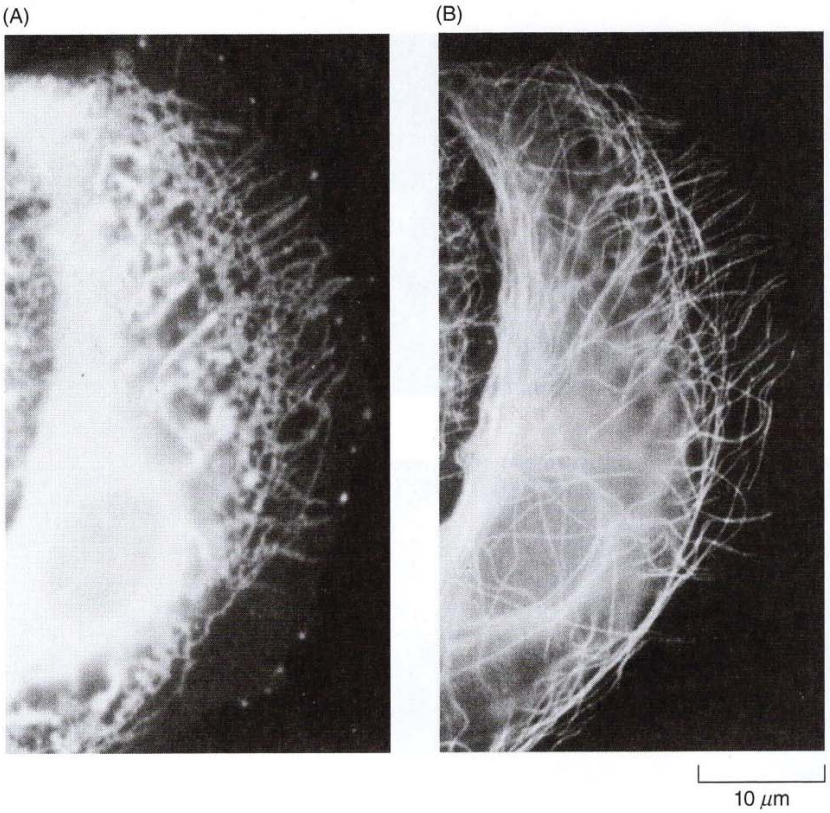


FIGURA 13.44 Asociación del retículo endoplasmático con los microtúbulos. Microscopia de fluorescencia del retículo endoplasmático (A) y de microtúbulos (B) en una célula epitelial. El retículo endoplasmático se ha teñido con un tinte fluorescente y los microtúbulos con un anticuerpo contra la tubulina. Obsérvese la estrecha relación entre el retículo endoplasmático y los microtúbulos en la periferia de la célula. (De M. Terasaki, L. B. Chen y K. Fujiwara, 1986. *J. Cell Biol.* 103: 1557.)

VÍDEO 13.5

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.5

Movimiento mitocondrial. Los microtúbulos y las proteínas motoras asociadas mueven las mitocondrias dentro de la célula.

de la célula. La selección de la mercancía puede ser muy específica. La quinesina II, un motor dirigido al extremo positivo, transporta los ARNm seleccionados hacia la corteza celular en ovocitos de *Xenopus*, un proceso que parece ser general para todos los vertebrados. La quinesina I de forma similar transporta actina en el embrión de *Drosophila*. Se cree también que dineínas y quinesinas específicas reconocen diferentes microtúbulos por las modificaciones postraduccionales de la tubulina. Por otra parte, algunos tipos de motores moleculares se asocian con una carga determinada al mismo tiempo, permitiendo un posicionamiento preciso de la carga. Por ejemplo, en la misma vesícula podrían estar unidas una quinesina dirigida al extremo «más», otra dirigida al extremo «menos», y quizás una dineína o una miosina, permitiendo el transporte en direcciones alternantes a lo largo de los microtúbulos o bien de los filamentos de actina. Un futuro desafío será determinar cómo el paso de un motor a otro controla el transporte.

Además de transportar vesículas de membrana en las vías endocíticas y secretoras, los microtúbulos y proteínas motoras asociadas posicionan los orgánulos encerrados por membranas (como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas y las mitocondrias) en el interior celular. Por ejemplo, el retículo endoplasmático se extiende a la periferia celular en asociación con los microtúbulos (**Fig. 13.44**). Los fármacos que despolimerizan los microtúbulos provocan que el retículo endoplasmático se retraiga hacia el centro de la célula, lo que indica que se requiere la asociación con los microtúbulos para mantener al retículo endoplasmático en su estado extendido. Esta colocación del retículo endoplasmático parece requerir la acción de la quinesina (o posiblemente múltiples miembros de la familia de la quinesina), que tira del retículo endoplasmático a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo «más», hacia la periferia celular. De forma similar, la quinesina parece que desempeña un papel clave en la colocación de los lisosomas alejados del centro de la célula, y en los movi-

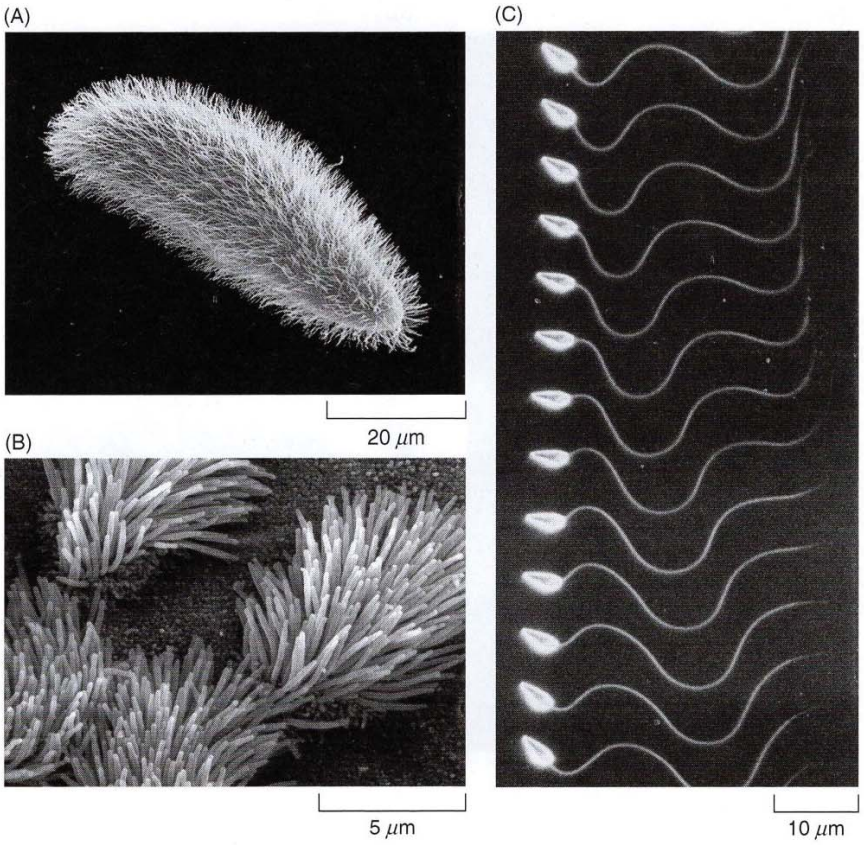


FIGURA 13.45 Ejemplos de cilios y flagelos. (A) Micrografía electrónica de barrido mostrando numerosos cilios recubriendo la superficie de *Paramecium*. (B) Micrografía electrónica de barrido de células epiteliales ciliadas recubriendo la superficie de la tráquea. (C) Fotografía de disparo múltiple (500 disparos por minuto) mostrando el movimiento ondulatorio de un flagelo de espermatozoide de erizo de mar. (C, por cortesía de C. J. Brokaw, California Institute of Technology.)

mientos de las mitocondrias se han implicado a tres miembros diferentes de la familia de la quinesina.

Por otro lado, se cree que la dineína citoplasmática interviene en la colocación del aparato de Golgi. El aparato de Golgi se localiza en el centro de la célula, cerca del centrosoma. Si los microtúbulos se disgregan, bien por un fármaco o bien cuando la célula entra en mitosis, el Golgi se rompe en pequeñas vesículas que se dispersan por todo el citoplasma. Cuando los microtúbulos se vuelven a formar, el aparato de Golgi también se reensambla, y parece ser que las vesículas del Golgi son transportadas al centro de la célula (hacia el extremo «menos» de los microtúbulos) por la dineína citoplasmática. Por tanto, el movimiento a lo largo de los microtúbulos es responsable no sólo del transporte de vesículas, sino también de estabilizar la posición de los orgánulos con membrana en el citoplasma de las células eucariotas.

VÍDEO 13.6

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.6

Movimientos ciliados. Los cilios cubren la superficie de algunos protozoos y son responsables de la motilidad celular y de dirigir las partículas de alimento a la cavidad oral.

Cilios y flagelos

Los **cilios** y **flagelos** son prolongaciones de la membrana plasmática constituidas por microtúbulos, responsables del movimiento de varios tipos de células eucariotas. Los cilios aparecen en un mayor número de tipos celulares, ya que se encuentran en casi todas las células animales. Muchas bacterias también poseen flagelos pero estos flagelos procariotas son bastante diferentes de los eucariotas. Los flagelos bacterianos (que no se van a tratar) son filamentos proteicos que se proyectan desde la superficie celular, en vez de prolongaciones de la membrana plasmática sostenidas por microtúbulos.

Los cilios y los flagelos eucarióticos son estructuras muy similares, cada una con un diámetro de 0,25 μm, aproximadamente (**Fig. 13.45**). Muchas células están recubiertas por numerosos cilios, de alrededor de 10 μm de lon-

VÍDEO 13.7

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.7

Flagelos en *Euglena*. Los flagelos son utilizados para la locomoción por diversos protozoos y por los espermatozoides.

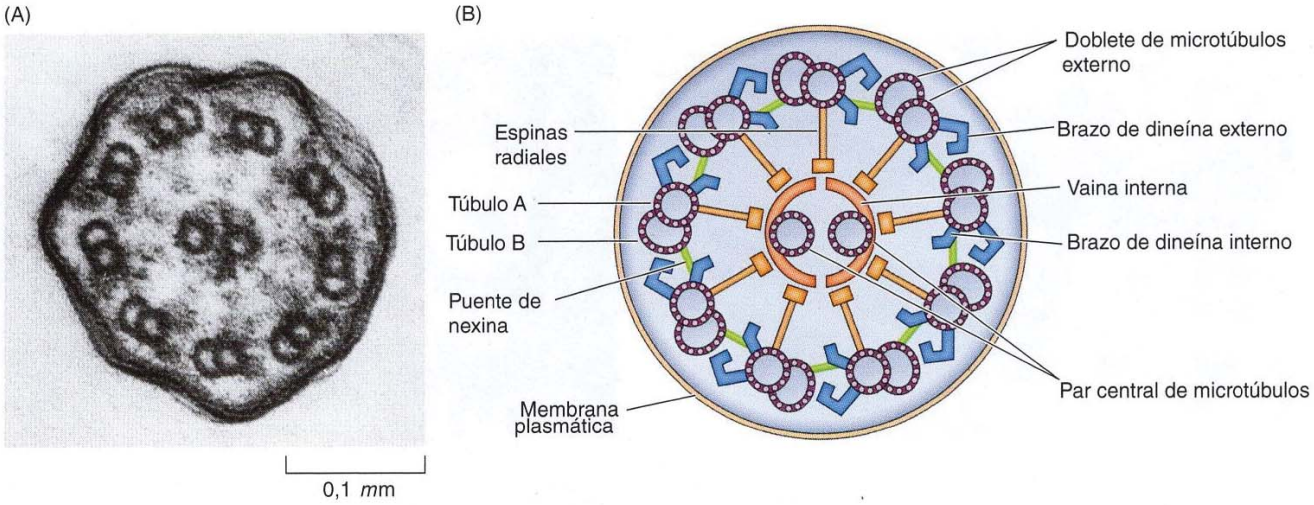


FIGURA 13.46 Estructura del axonema de cilios y flagelos. (A) Micrografía electrónica tratada por ordenador de una sección transversal del axonema de un flagelo de espermatozoide de rata. (B) Esquema de una sección transversal de un axonema. Los nueve dobletes de microtúbulos externos formados por un túbulo A completo, que contiene 13 protofilamentos, y un túbulo incompleto B, que contiene 10 u 11 protofilamentos. Los dobletes externos se unen entre sí por puentes de nexina y al par central de microtúbulos mediante espinas radiales. Cada doblete de microtúbulos externo está unido a brazos de dineína internos y externos.

VÍDEO 13.8

sites.sinauer.com/cooper7e/v13.8

Movimiento coordinado de los cilios. En los animales, el movimiento coordinado de los cilios facilita el desplazamiento de fluidos o mucosidad sobre una superficie.

gitud. Los cilios baten en un movimiento coordinado de atrás hacia adelante, de tal manera que la célula se desplaza a través de un fluido o bien el fluido se desplaza sobre la superficie celular. Por ejemplo, los cilios de algunos protozoos (como el *Paramecium*) son los responsables tanto de la movilidad celular como del barrido de organismos hacia la cavidad oral para su alimentación. Una función importante de los cilios en los animales es el movimiento de los fluidos y del *mucus* sobre la superficie de las capas de células epiteliales. Un buen ejemplo viene dado por las células ciliadas que recubren el tracto respiratorio, que lo limpian de *mucus* y polvo. Los flagelos se diferencian de los cilios en su longitud (pueden llegar a medir 200 µm) y en su tipo de batido, que es ondulatorio. Las células generalmente tienen solamente uno o dos flagelos, que son los responsables de la locomoción de varios tipos de protozoos y de los espermatozoides.

La estructura fundamental tanto de los cilios como de los flagelos es el **axonema**, que está constituido por microtúbulos y sus proteínas asociadas (**Fig. 13.46**). Los microtúbulos se disponen en un patrón característico de «9 + 2» en el que un par central de microtúbulos se encuentra rodeado por nueve dobletes de microtúbulos exteriores. Los dos microtúbulos fusionados de cada doblete exterior son distintos: uno (denominado el túbulo A) es un microtúbulo completo constituido por 13 protofilamentos; el otro (el túbulo B) está incompleto, constituido solamente por 10 u 11 protofilamentos unidos al túbulo A. Los dobletes exteriores de microtúbulos se conectan al par central mediante espinas radiales y entre sí mediante puentes formados por una proteína denominada **nexina**. Además, a cada túbulo A están unidos dos brazos de dineína, y es la actividad motora de estas dineínas axonémicas la que dirige el batido de los cilios y flagelos.

Los extremos «menos» de los microtúbulos de los cilios y flagelos están unidos a un **cuerpo basal** que tiene una estructura similar a la del centríolo y que contiene nueve tripletes de microtúbulos (**Fig. 13.47**). Vimos anteriormente que los centríolos eran componentes del centrosoma, sin que su fun-

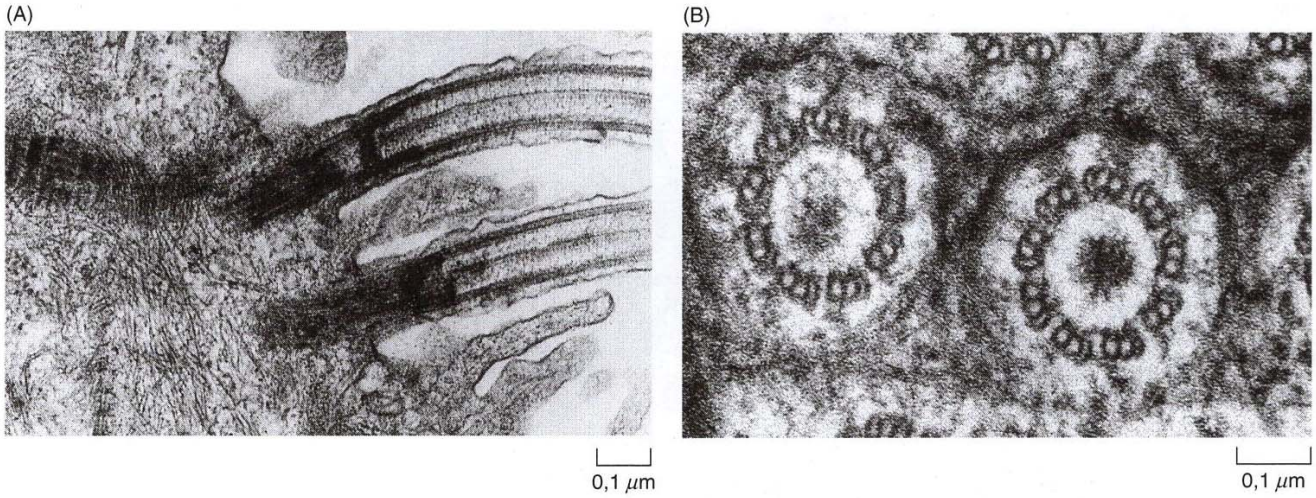


FIGURA 13.47 Micrografías electrónicas de los cuerpos basales. (A) Vista longitudinal de cilios anclados en los cuerpos basales. (B) Sección transversal de cuerpos basales. Cada cuerpo basal está constituido por nueve tripletes de microtúbulos.

ción estuviera clara. Sin embargo, los cuerpos basales tienen un papel definido en la organización de los microtúbulos del axonema. Los cuerpos basales provienen de cilios transportados hacia la membrana plasmática. Los dobletes de microtúbulos externos del axonema se forman por extensión de dos de los microtúbulos de cada triplete del cuerpo basal. Por tanto, los cuerpos basales sirven para iniciar el crecimiento de los microtúbulos del axonema, además de anclar a cilios y flagelos a la superficie de la célula.

Los movimientos de los cilios y flagelos se producen por el deslizamiento de los dobletes externos de microtúbulos uno respecto a otro, impulsados por la actividad motora de la dineína axonémica (**Fig. 13.48**). La base de la dineína se une a los túbulos A mientras que los grupos de cabeza de la dineína se unen a los túbulos B de los dobletes adyacentes. El movimiento del grupo de cabeza de la dineína hacia el extremo «menos» provoca que el túbulo A de un doblete se deslice hacia el extremo basal del túbulo B adyacente. Debido a que los dobletes de microtúbulos en un axonema están unidos por puentes de nexina, el deslizamiento de un doblete sobre otro hace que se doblen, lo que constituye la base del movimiento de batido de cilios y flagelos. Sin embargo, está claro que las actividades de las moléculas de dineí-

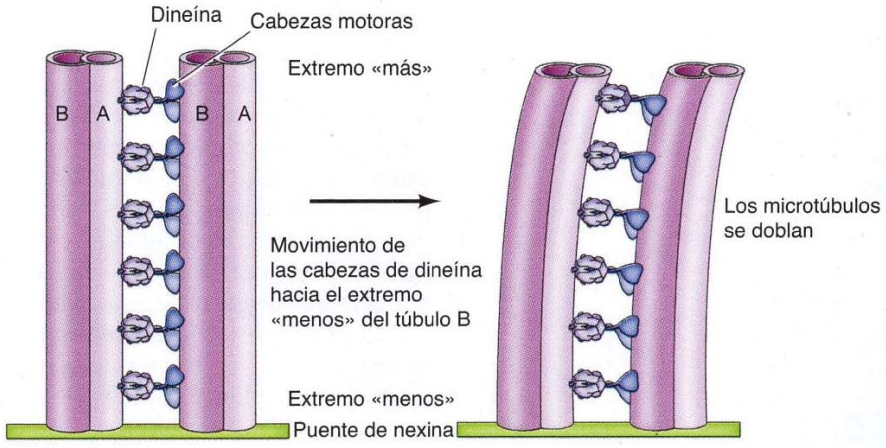


FIGURA 13.48 Movimiento de los microtúbulos en los cilios y flagelos. Las bases de los brazos de dineína se unen a los túbulos A, y las cabezas motoras interaccionan con los túbulos B de los dobletes adyacentes. El movimiento de las cabezas de dineína hacia el extremo «menos» (hacia la base del cilio) provoca entonces que el túbulo A de un doblete se deslice hacia la base del túbulo B adyacente. Debido a que ambos dobletes de microtúbulos están conectados por puentes de nexina, este movimiento de deslizamiento les obliga a doblarse.

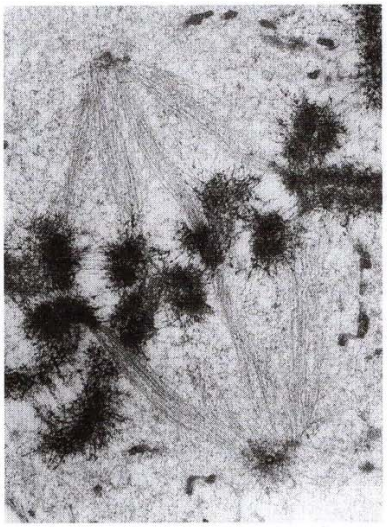
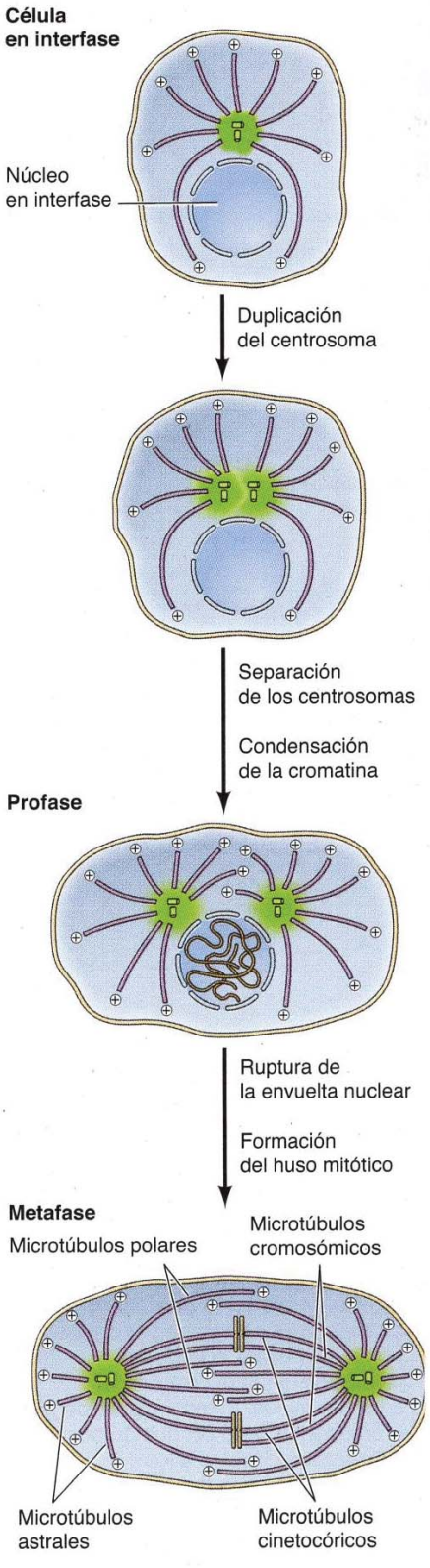


FIGURA 13.49 Micrografía electrónica del huso mitótico. Los microtúbulos del huso se unen a los cromosomas condensados en la metafase.



na en regiones diferentes del axonema se deben regular cuidadosamente para producir el batido coordinado de los cilios y las oscilaciones ondulatorias de los flagelos —un proceso del que todavía se conoce muy poco.

Reorganización de los microtúbulos durante la mitosis

Como ya se comentó, los microtúbulos se reorganizan completamente durante la mitosis, lo que proporciona un claro ejemplo de la importancia de su inestabilidad dinámica. El conjunto de microtúbulos presente en las células interfásicas se disgrega y las subunidades libres de tubulina se reensamblan para formar el **huso mitótico**, responsable de la segregación de los cromosomas hijos (**Fig. 13.49**). Esta reestructuración del citoesqueleto de microtúbulos es dirigida por la duplicación del centrosoma para formar dos centros organizadores de microtúbulos, separados en polos opuestos del huso mitótico.

Los centríolos y otros componentes del centrosoma se duplican en las células interfásicas, pero permanecen juntos a un lado del núcleo hasta el comienzo de la mitosis (**Fig. 13.50**). Entonces se separan los dos centrosomas y migran a lados opuestos del núcleo, formando los dos polos del huso mitótico. A medida que la célula entra en mitosis, la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos también cambia drásticamente. Primero, la velocidad de desensamblaje de los microtúbulos aumenta cerca de diez veces, lo que origina una despolimerización general y un acortamiento de los microtúbulos. A su vez, el número de microtúbulos que emana desde el centrosoma aumenta entre cinco y diez veces. En suma, estos cambios producen el desensamblaje de los microtúbulos interfásicos y el crecimiento de un gran número de microtúbulos cortos a partir de los centrosomas.

Como propusieron por primera vez Marc Kirschner y Tim Mitchison en 1986, la formación del huso mitótico implica la estabilización selectiva de

FIGURA 13.50 Formación del huso mitótico. Los centríolos y los centrosomas se duplican durante la interfase. Durante la profase de la mitosis, los centrosomas duplicados se separan y migran a lados opuestos del núcleo. Entonces la envuelta nuclear se desintegra y los microtúbulos se reorganizan para formar el huso mitótico. Los microtúbulos cinetocóricos se unen a los cromosomas condensados, los microtúbulos polares se solapan unos con otros en el centro de la célula, y los microtúbulos astrales se extienden hacia la periferia de la célula. En la metafase, los cromosomas condensados se alinean en el centro del huso.

algunos de los microtúbulos que irradian desde el centrosoma. Estos microtúbulos son de tres tipos, dos de los cuales componen el huso mitótico. Los **microtúbulos cinetocóricos** se unen a los cromosomas condensados de las células mitóticas en sus centrómeros, que están asociados con proteínas específicas para formar el cinetocoro (véase Fig. 6.24). La fijación al cinetocoro estabiliza a estos microtúbulos, los cuales, como se verá después, desempeñan un papel crítico en la segregación de los cromosomas mitóticos. También se encuentran emanando de los centrosomas los **microtúbulos cromosómicos**, que conectan con los extremos de los cromosomas vía la cromoquinesina. El tercer tipo de microtúbulos que se encuentran en el huso mitótico (**microtúbulos interpolares**) no se unen a los cromosomas. Por el contrario, los microtúbulos interpolares que emanan desde los dos centrosomas se estabilizan al solaparse uno sobre otro en el centro de la célula. Los **microtúbulos astrales** se extienden desde los centrosomas hacia la periferia de la célula, con sus extremos «más» anclados en la corteza celular. Como se tratará posteriormente, tanto los microtúbulos astrales como los interpolares contribuyen también al movimiento de los cromosomas al separar los polos del huso.

Según transcurre la mitosis, los cromosomas condensados primero se alinean en la placa metafásica y luego se separan, tirando de las dos cromátidas de cada cromosoma hacia polos opuestos del huso. Proteínas motoras asociadas con los microtúbulos del cinetocoro intervienen en el movimiento de los cromosomas, como se describe a continuación. En la etapa final de la mitosis se vuelve a formar la envuelta nuclear, los cromosomas se descondensan, y tiene lugar la citocinesis. Cada célula hija contiene entonces un centrosoma que dirige la formación de una nueva red de microtúbulos interfásicos.

Movimiento cromosómico

Después de que los dos centrosomas se han desplazado a extremos opuestos de la célula al principio de la mitosis, los cromosomas duplicados se unen al cinetócoro y a los microtúbulos cromosómicos, y se alinean en la fase metafásica, equidistantes de ambos polos. Esta alineación de cromosomas está mediada por un crecimiento rápido de los microtúbulos del cinetócoro y la captura de cinetócoros por parte de las proteínas que se dirigen a los extremos positivos. Adicionalmente, los extremos cromosómicos son empujados hacia la placa metafásica por la cromoquinesina que se desplaza sobre los microtúbulos cromosómicos. Una vez que todos los cromosomas se han alineado en la placa metafásica, las uniones entre cromátidas hermanas se escinden y comienza la anafase con la separación de las cromáticas hermanas y su desplazamiento hacia polos opuestos del huso acromático. El movimiento cromosómico procede por dos mecanismos distintos, conocidos como anafase A y anafase B, que implican tipos diferentes de microtúbulos del áster.

La **anafase A** consiste en el movimiento de cromosomas hacia los polos del áster sobre los microtúbulos del cinetócoro, que se acortan a medida que avanza el movimiento cromosómico (**Fig. 13.51**). El movimiento de los cromosomas por los microtúbulos del huso hacia el extremo «menos» (acercándose a los centrosomas) está producido por quinesinas cromosómicas unidas a los extremos «más» de los microtúbulos. Estas quinesinas funcionan como enzimas despolimerizadoras de microtúbulos que desensamblan y acortan los microtúbulos del cinetocoro y los cromosómicos mientras los cromosomas se desplazan hacia los polos opuestos del huso.

La **anafase B** se refiere a la separación de los polos del huso acromático en sí (**Fig. 13.52**). La separación de los polos del huso acromático está acompañada por la elongación de los microtúbulos interpolares y es similar a la separación inicial de los centrosomas duplicados para formar los polos del

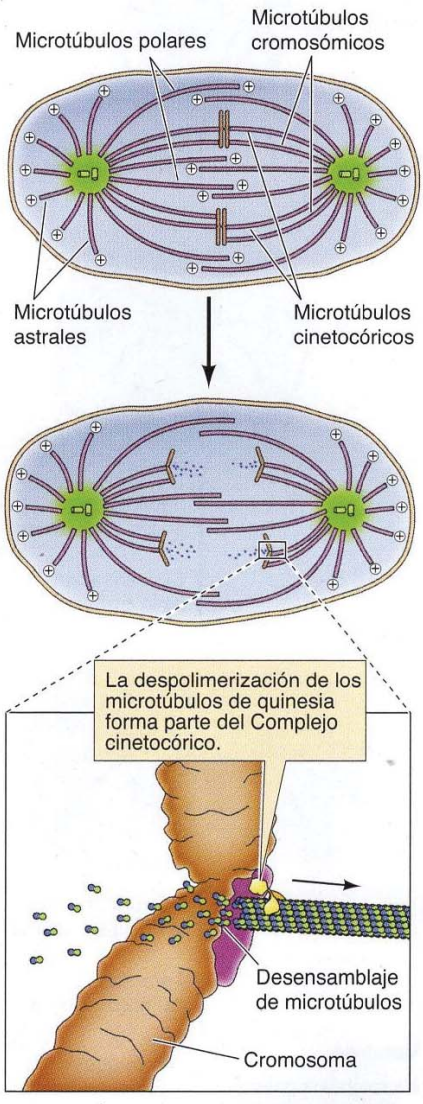


FIGURA 13.51 Movimiento de los cromosomas en la anafase A. Los cromosomas se mueven hacia los polos del huso a lo largo del cinetocoro y los microtúbulos cromosómicos. El movimiento de los cromosomas está producido por las cinesinas asociadas a los cromosomas, que despolimerizan y acortan los microtúbulos cinetocóricos y los cromosómicos.

huso al principio de la mitosis (véase Fig. 13.50). Durante la anafase B los microtúbulos interpolares solapantes se deslizan unos sobre otros, separando los polos del huso. Este tipo de movimiento se ha demostrado que resulta de la acción de varias quinesinas de dirección positiva, que forman enlaces cruzados con los microtúbulos y los desplazan alejándolos del polo del huso acromático. Adicionalmente, los polos del huso son separados por los microtúbulos astrales. Este tipo de movimiento implica la acción de la dineína citoplásmica anclada a la corteza celular. El movimiento de esta dineína anclada sobre los microtúbulos astrales en dirección al extremo negativo separa a los polos del huso hacia la periferia celular. Las despolimerasas producen un acortamiento simultáneo de los microtúbulos astrales, dando lugar a la separación de los polos del huso acromático y su desplazamiento hacia la periferia celular, antes de la formación de las dos células hijas al final de la mitosis.

Filamentos intermedios

Los **filamentos intermedios** poseen diámetros de entre 10 nm y 12 nm, que es intermedio entre los diámetros de los otros dos elementos principales del citoesqueleto, los filamentos de actina (de unos 7 nm) y los microtúbulos (de unos 25 nm). A diferencia de los filamentos de actina y de los microtúbulos, los filamentos intermedios no están directamente implicados en los movimientos celulares, incluida la señalización intracelular. En cambio, ambos desempeñan un papel primordial proporcionando la fuerza mecánica a los tejidos celulares y proporcionan un medio para la localización de procesos celulares, incluyendo la señalización intracelular. Algunas bacterias

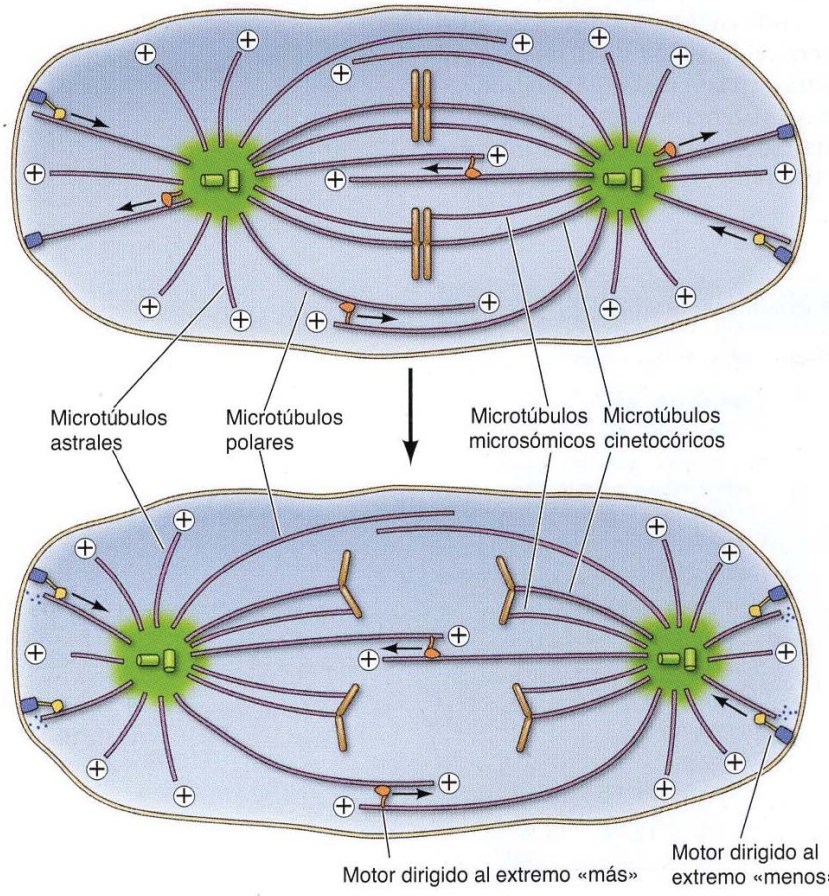


FIGURA 13.52 Separación de los polos del huso en la anafase B. La separación de los polos del huso se produce por dos tipos de movimientos. Primero, los microtúbulos interpolares solapados deslizan unos sobre otros empujando y separando los polos del huso, probablemente como resultado de la acción de proteínas motoras dirigidas hacia el extremo «más». En segundo lugar, los microtúbulos astrales tiran de los polos del huso y los separan. La fuerza conductora podría ser un motor dirigido hacia el extremo «menos», fijado a una estructura citoplasmática, como el córtex celular.

contienen proteínas relaciondas con filamentos intermedios eucariotas, que se ensamblan en filamentos bajo la membrana plasmática bacteriana. Sin embargo, aunque los filamentos intermedios citoplásmicos son característicos de la mayoría de los animales multicelulares, están ausentes en levaduras, plantas y algunos insectos.

◆ Las propiedades físicas de los filamentos intermedios están bien adaptadas a su papel de proporcionar soporte estructural. Normalmente no son muy rígidos pero se endurecen y resisten la rotura cuando se someten a un estrés elevado.

Proteínas de los filamentos intermedios

Mientras que los filamentos de actina y los microtúbulos son polímeros compuestos por varias familias de proteínas con una organización estructural común expresadas por distintos tipos celulares. Los filamentos intermedios están compuestos por diversas proteínas que se expresan en distintos tipos de células. Más de 70 proteínas diferentes de filamentos intermedios han sido identificadas y clasificadas en seis grupos en función de las similitudes entre sus secuencias de aminoácidos (**Tabla 13.3**). Los tipos I y II corresponden a dos grupos de **queratinas**, constituidos cada uno por aproximadamente 15 proteínas diferentes, que se expresan en las células epiteliales. Cada tipo de célula epitelial sintetiza al menos una queratina de tipo I (ácida) y una de tipo II (neutra/básica), que copolimerizan para formar filamentos. Algunas queratinas de tipos I y II (denominadas queratinas duras) son constituyentes de estructuras tales como pelo, uñas y cuernos. Las otras queratinas de tipos I y II (queratinas blandas) son abundantes en el citoplasma de las células epiteliales, expresándose queratinas diferentes en los distintos tipos celulares diferenciados.

Las proteínas tipo III de filamentos intermedios incluyen a la **vimentina**, que se encuentra en diferentes tipos de células, incluyendo fibroblastos, células de músculo liso y glóbulos blancos sanguíneos. A diferencia de los filamentos de actina, la vicentina forma una red que se extiende desde el núcleo hacia la periferia celular. Otra proteína tipo III, la **desmina**, se expresa de manera específica en las células musculares, donde conecta los discos Z de los elementos contráctiles individuales. Una tercera proteína tipo III de filamentos intermedios se expresa de forma específica en las células gliales (con soporte neuronal), y una cuarta en neuronas del sistema nervioso periférico.

Las proteínas tipo IV de filamentos intermedios incluyen a las tres **proteínas de neurofilamentos (NF)** (designadas NF-L, NF-M, y NF-H de *l*ight

TABLA 13.3 Proteínas de los filamentos intermedios

Tipo	Proteína	Tamaño (kDa)	Lugar de expresión
I	Queratinas ácidas	40–60	Células epiteliales
II	Queratinas neutras o básicas	50–70	Células epiteliales
III	Vimentina	54	Fibroblastos, glóbulos blancos sanguíneos y otros tipos de células
	Desmina	53	Células musculares
	Proteína ácida fibrilar glial	51	Células gliales
	Periferina	57	Neuronas periféricas
IV	Proteínas de neurofilamentos		
	NF-L	67	Neuronas
	NF-M	150	Neuronas
	NF-H	200	Neuronas
	α-Internexina	66	Neuronas
	Nestina	200	Células madre
V	Láminas nucleares	60–75	Lámina nuclear de todo tipo de células

—ligera—, *m*edium —media—, *h*eavy —pesada—, respectivamente). Estas proteínas forman los filamentos intermedios principales de muchos tipos de neuronas maduras. Abundan principalmente en los axones de las neuronas motoras y se piensa que desempeñan un papel crítico en el sostén de estas prolongaciones largas y delgadas, que pueden extenderse más de un metro de longitud. Otra proteína tipo IV, la nestina, se expresa durante el desarrollo embrionario en varios tipos de células madre. Las nestinas se diferencian de otros filamentos intermedios en que solo se polimerizan si en la célula están presentes otros filamentos intermedios.

Las proteínas tipo V de los filamentos intermedios son las láminas nucleares. En vez de pertenecer al citoesqueleto, las láminas son componentes del núcleo, donde forman una malla ortogonal por debajo de la membrana nuclear (véase Fig. 10.5).

Ensamblaje de los filamentos intermedios

A pesar de la considerable diversidad en el tamaño y en la secuencia de aminoácidos, las diferentes proteínas de filamentos intermedios muestran una organización estructural común (**Fig. 13.53**). Todas tienen un dominio en α-hélice como eje central de aproximadamente 310 aminoácidos (350 aminoácidos en las láminas nucleares). Este dominio de eje central está flanqueado por dominios amino- y carboxilo- terminales, que varían entre las diferentes proteínas de filamentos intermedios en tamaño, secuencia y estructura secundaria. Como se tratará a continuación, el dominio central en α-hélice juega un papel fundamental en el ensamblaje de los filamentos, mientras que los dominios variables de la cabeza y la cola presumiblemente determinan las funciones específicas de las diferentes proteínas de los filamentos intermedios.

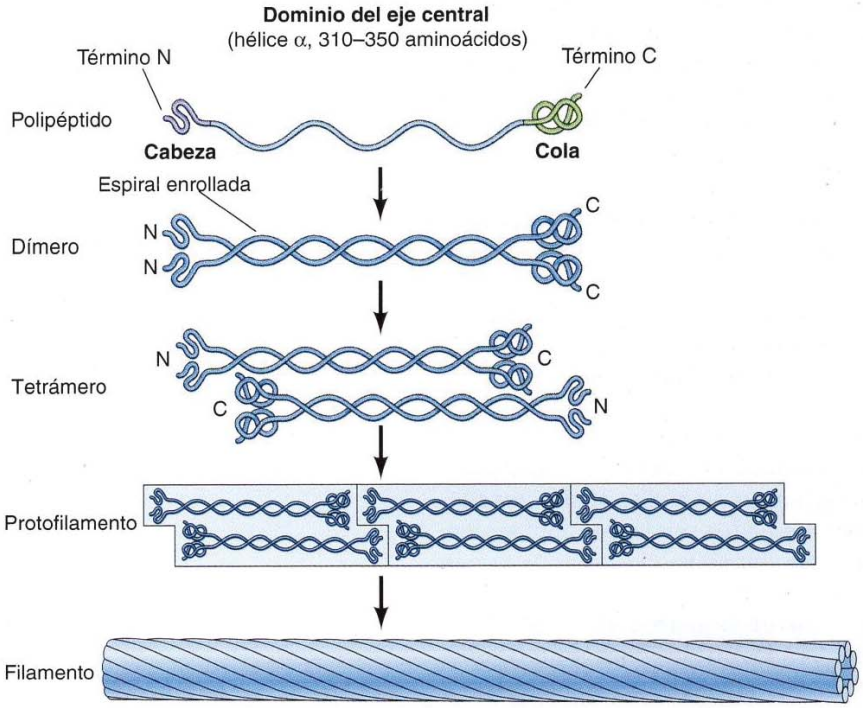


FIGURA 13.53 Estructura y ensamblaje de filamentos intermedios. Las proteínas de los filamentos intermedios contienen dominios en hélice α como eje central y dominios de cabeza N-terminales y de cola C-terminales. Los dominios centrales de dos polipéptidos se enrollan en una estructura de hélice para formar dímeros. Después, los dímeros se asocian de manera escalonada antiparalela y forman tetrámeros. Los tetrámeros se asocian extremo con extremo para constituir protofilamentos y, unidos en sentido lateral, forman filamentos. Cada filamento contiene aproximadamente ocho protofilamentos enrollados entre sí en una estructura a modo de cuerda.

El primer paso en el ensamblaje de los filamentos es la formación de dímeros en los cuales los dominios de eje central de dos cadenas polipeptídicas están enrollados uno alrededor del otro en una estructura de espiral enrollada (*coiled-coil*), similar a la formada por las cadenas pesadas de la miosina II. Los dímeros entonces se asocian de un modo escalonado antiparalelo para formar tetrámeros, que se ensamblan extremo con extremo para formar protofilamentos. Un paso común es la interacción de aproximadamente ocho protofilamentos enrollados entre sí en una estructura similar a una cuerda. Debido a que el ensamblaje se produce a partir de tetrámeros antiparalelos, ambos extremos de los filamentos intermedios son equivalentes. Por tanto, y a diferencia de los filamentos de actina y de los microtúbulos, los filamentos intermedios son apolares; no tienen extremos diferenciados, como los ex-

tremos protuberantes y puntiagudos de los filamentos de actina o los extremos más y menos de los microtúbulos.

El ensamblaje de filamentos requiere interacciones entre los tipos específicos de proteínas de filamentos intermedios. Por ejemplo, los filamentos de queratina siempre se ensamblan a partir de heterodímeros que contienen un polipéptido de tipo I y uno de tipo II. Por el contrario, las proteínas de tipo III pueden ensamblarse en filamentos constituidos por un único polipéptido (p. ej., vimentina) o constituidos por dos proteínas de tipo III diferentes (p. ej., vimentina más desmina). Sin embargo, las proteínas de tipo III no forman copolímeros con las queratinas. Las proteínas tipo III, sin embargo, no forman copolímeros con las queratinas. Los filamentos intermedios son por lo general más estables que los filamentos de actina o los microtúbulos, y no muestran los comportamientos dinámicos controlados por la unión de nucleótidos asociados a estos otros elementos del citoesqueleto. No obstante, los filamentos intermedios sí son dinámicos dentro de la célula. La mayoría de las proteínas de los filamentos intermedios pueden modificarse por fosforilación, que regula su ensamblaje y desensamblaje. El ejemplo más claro es la fosforilación de las láminas nucleares (véase Cap. 17), que da como resultado en el desensamblaje de la lámina nuclear y la disgregación de la envuelta nuclear durante la mitosis. Los filamentos intermedios citoplasmáticos, como la vimentina, también son fosforilados, lo que puede llevar a su desensamblaje y reorganización durante los procesos de división o migración celular.

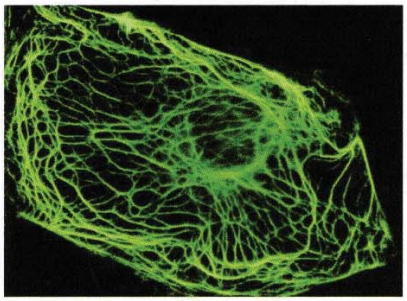


FIGURA 13.54 Organización intracelular de los filamentos de queratina. Micrografía de células epiteliales teñidas con anticuerpos fluorescentes contra la queratina (verde). Los filamentos de queratina se extienden a partir de un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática.

Organización intracelular de los filamentos intermedios

Los filamentos intermedios forman una elaborada red en el citoplasma de la mayoría de las células, extendiéndose a partir de un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática (**Fig. 13.54**). Tanto los filamentos de queratina como los de vimentina se fijan a la envuelta nuclear, aparentemente con la función de posicionar y anclar el núcleo dentro de la célula. Además, los filamentos intermedios pueden asociarse no sólo con la membrana plasmática sino también con los otros elementos del citoesqueleto, filamentos de actina y microtúbulos. Por tanto, los filamentos intermedios proporcionan un andamiaje que integra a los componentes del citoesqueleto y organiza la estructura interna de la célula.

Los filamentos de queratina de las células epiteliales están fuertemente anclados a la membrana plasmática en dos áreas especializadas de contacto celular, los **desmosomas** y **hemidesmosomas** (**Fig. 13.55**). Los desmosomas son uniones entre células adyacentes, en las que los contactos célula-célula están mediados por proteínas transmembrana relacionadas con las cadherinas. En su lado citoplasmático, los desmosomas se asocian con una placa densa característica de proteínas intracelulares, a la que se anclan los filamentos de queratina. Estos anclajes están mediados por la desmoplaquina, un miembro de una familia de proteínas denominadas **plaquinas** que unen filamentos intermedios y los vinculan a otras estructuras celulares. Los hemidesmosomas son uniones morfológicamente similares entre las células epiteliales y el tejido conectivo subyacente, en las que los filamentos de queratina se unen a las integrinas a través de otros miembros de la familia de las plaquinas (p. ej., plectina). Por tanto, los desmosomas y hemidesmosomas unen los filamentos intermedios a regiones de contacto célula-célula o célula-sustrato, respectivamente, de forma similar a como se une el citoesqueleto de actina a la membrana plasmática en las uniones adherentes y en las adhesiones focales. Es importante destacar que los filamentos de queratina anclados a ambos lados de los desmosomas sirven como un nexo mecánico entre las células adyacentes de una capa epitelial, lo que proporciona estabilidad mecánica a todo el tejido.

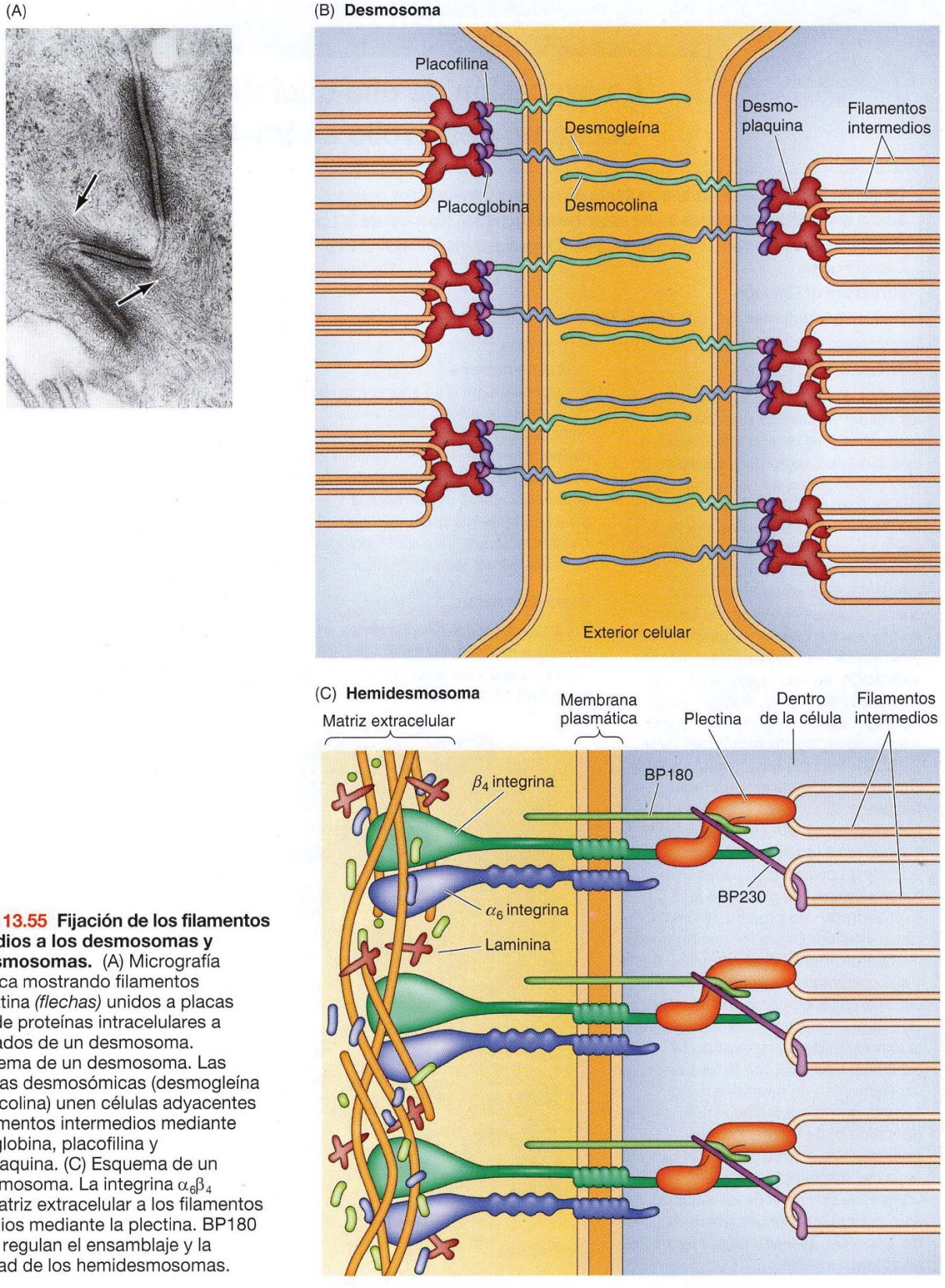


FIGURA 13.55 Fijación de los filamentos intermedios a los desmosomas y hemidesmosomas. (A) Micrografía electrónica mostrando filamentos de queratina *(flechas)* unidos a placas densas de proteínas intracelulares a ambos lados de un desmosoma. (B) Esquema de un desmosoma. Las cadherinas desmosómicas (desmogleína y desmocolina) unen células adyacentes a los filamentos intermedios mediante la placoglobina, placofilina y desmoplaquina. (C) Esquema de un hemidesmosoma. La integrina $\alpha_6\beta_4$ une la matriz extracelular a los filamentos intermedios mediante la plectina. BP180 y BP230 regulan el ensamblaje y la estabilidad de los hemidesmosomas.

EXPERIMENTO CLAVE

La expresión de una queratina mutante causa un desarrollo anómalo de la piel

La expresión de una queratina mutante en ratones transgénicos causa serias anomalías semejates a una enfermedad genética humana de la piel

Robert Vassar, Pierre A. Coulombe, Linda Degenstein, Kathryn Albers y Elaine Fuchs

University of Chicago

Cell, 1991, Volumen 64, págs. 365-380

Elaine Fuchs

Contexto

En 1991, los filamentos intermedios de las células epiteliales eran bien conocidos y se estaba estudiando la aparición, a lo largo del desarrollo, de diferentes formas de queratinas de tipo I y tipo II en la piel. Pero la función de los filamentos intermedios seguía siendo un misterio. Mientras que todas las células de los vertebrados contienen filamentos intermedios, las líneas celulares que carecen de ellos sobreviven en cultivo y siguen proliferando. Así, cualquiera que fuese su función, no eran importantes para las células en cultivo, aunque quizás sí para las células en el interior de los tejidos de organismos multicelulares.

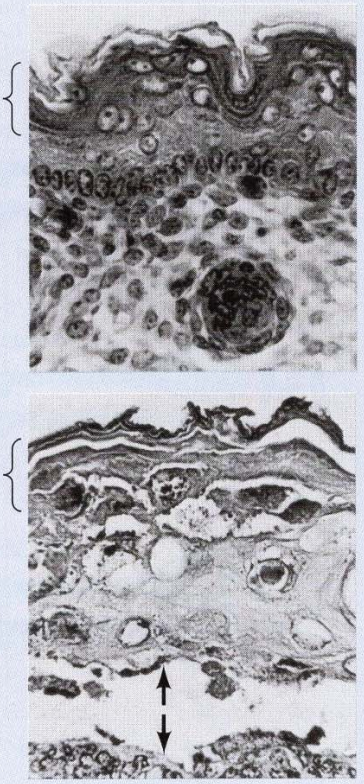
Elaine Fuchs y sus colaboradores sabían que durante el desarrollo temprano, el epitelio de la piel expresaba queratina 5 (de tipo I) y queratina 14 (de tipo II). Puesto que las queratinas polimerizan como heterodímeros, se creía que la expresión de una proteína anómala podía interferir con la formación de los filamentos intermedios normales. Fuchs y sus colaboradores inicialmente estudiaron esta posibilidad en células de la piel en cultivo, y demostraron que la expresión de una queratina 14 truncada, interfería con la formación de los filamentos de queratina. Esto sugería que la expresión similar de una queratina mutante en ratones transgénicos, podría causar un defecto en la red de filamentos intermedios de las células de la piel de un embrión. Si esto ocurría, proporcionaría una prueba del papel de los filamentos intermedios en el tejido intacto.

En los experimentos aquí descritos, Fuchs y sus colaboradores demostraron que la expresión de una queratina mutante en ratones transgénicos, no sólo alteraba la red de los filamentos intermedios en las células de la piel, sino que también desencadenaba defectos severos en la organización y estabilidad del tejido de la piel. Así, estos experimentos proporcionaron la primera demostración de un papel fisiológico para los filamentos intermedios.

Experimentos

Para sus primeros experimentos en células en cultivo, Fuchs y colaboradores construyeron un gen de queratina 14 mutante, en el que se expresaba una proteína truncada que carecía del 30% de la región central del dominio α-hélice y de toda la cola carboxilo terminal, a partir del promotor normal de la queratina. Para investigar el papel de la queratina 14 en el desarrollo temprano del ratón, introdujeron el plásmido que codificaba esta queratina 14 mutante en óvulos fertilizados de ratón, que se transfirieron a madres adoptivas y se permitió el desarrollo de la descendencia. Toda la descendencia fue analizada para la queratina 14, y algunos eran transgénicos y expresaban la queratina 14 mutante.

La mayoría de los animales transgénicos murieron en las 24 horas siguientes al nacimiento. Aquellos que sobrevivieron más tiempo mostraron anomalías severas de la piel, incluyendo ampollas debido a la lisis de células epidérmicas después de traumas mecánicos leves, como el rozamiento de la piel. El análisis mediante tinción de secciones de tejido de la piel de los animales trangénicos, demostró la severa desorganización de la epidermis de los animales más



Piel de un ratón normal y uno transgénico. (Arriba) Piel de un ratón normal que muestra las capas externas altamente organizadas (corchetes) sin espacios intermedios entre el tejido intacto subyacente. (Abajo) Piel de un ratón transgénico que muestra una severa desorganización de las capas externas, que contienen espacios debido a la abrasión por traumatismos mecánicos y se encuentran separadas del tejido subyacente *(flechas)*.

EXPERIMENTO CLAVE

afectados (véase figura) y zonas de tejido desorganizado en el resto. La expresión por zonas es característica de un animal mosaico donde parte del tejido se desarrolla a partir de células embrionarias normales y otra a partir de células que portan el transgén. Analizando la expresión de la proteína mutante, encontraron que las áreas de tejido desorganizado se correlacionaban con la expresión de la queratina 14 mutante. Adicionalmente, existía una clara correlación entre la cantidad de epidermis desorganizada y la susceptibilidad de sufrir lesiones de la piel y la muerte durante el trauma del nacimiento.

Fuchs y sus colaboradores observaron además que el patrón de desorganización tisular en los ratones transgénicos se parecía al observado en un grupo de enfermedades cutáneas humanas denominadas epidermólisis bullosa simplex. Así, compararon secciones de tejido de ratones transgénicos, con secciones obtenidas de la piel de un paciente humano, y encontraron patrones muy similares de alteración tisular. A partir de estas observaciones, Fuchs y sus colaboradores concluyeron que los defectos en las queratinas o proteínas de los filamentos intermedios podían ser una causa de enfermedades genéticas humanas de la piel.

Impacto

Las anomalías de la piel de estos ratones transgénicos proporcionaron la primera prueba directa del presunto papel de las queratinas, como fuentes de fuerza mecánica para las células epiteliales en los tejidos. Actualmente, se sabe que el citoesqueleto de los filamentos intermedios es crítico para la estructura de los tejidos como la piel, intestino, corazón y el músculo esquelético, que están sujetos a estrés mecánico. Por el contrario, los eucariotas unicelulares como las levaduras y muchos pequeños invertebrados sobreviven perfectamente en ausencia de filamentos intermedios, a menudo modificando el citoesqueleto de actina o de tubulina para que cumpla un papel estructural. Los resultados de Fuchs y sus colaboradores también sugirieron una base para varias enfermedades humanas. De hecho, existen ahora más de diecisiete queratinas diferentes cuya defectuosidad se asocia con enfermedades humanas; estas incluyen tanto a la queratina 5 como a la queratina 14, inicialmente estudiadas en ratones transgénicos.

Además de unir los filamentos intermedios a las uniones celulares, algunas plaquinas unen los filamentos intermedios a otros elementos del citoesqueleto. La plectina, por ejemplo, se une a filamentos de actina y a microtúbulos además de a filamentos intermedios, por lo que puede proporcionar puentes entre estos componentes del citoesqueleto (**Fig. 13.56**). Se piensa que estos puentes con los filamentos intermedios refuerzan y estabilizan los filamentos de actina y los microtúbulos, lo que incrementa la estabilidad mecánica de la célula.

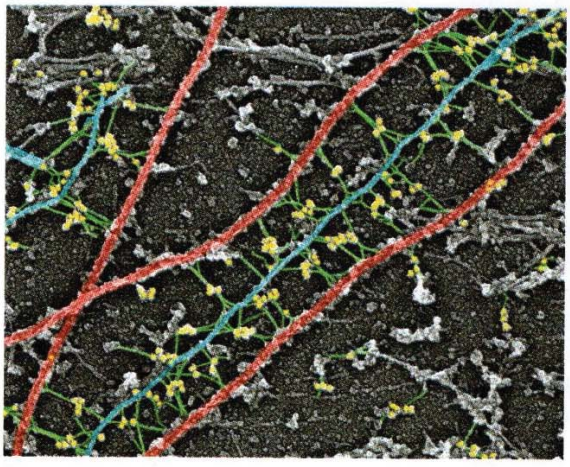


FIGURA 13.56 Micrografía electrónica de puentes de plectina entre filamentos intermedios y microtúbulos. Micrografía de un fibroblasto teñido con un anticuerpo contra la plectina. La micrografía ha sido coloreada artificialmente para mostrar la plectina (verde), los anticuerpos contra la plectina (amarillo), los filamentos intermedios (azul) y los microtúbulos (rojo). (Cortesía de Tatyana Svitkina y Gary Borisy, University of Wisconsin/Madison.)

Dos tipos de filamentos intermedios, la desmina y los neurofilamentos, desempeñan un papel especializado en el músculo y en las células nerviosas, respectivamente. La desmina conecta los ensamblajes individuales de actina-miosina de las células musculares entre sí y a la membrana plasmática, vinculando de esta manera la acción de los elementos contráctiles individuales. Varias mutaciones del gen de la desmina dan lugar a múltiples trastornos musculares, como miocardiopatías de inicio precoz. Los neurofilamentos son los filamentos intermedios principales en la mayoría de las neuronas maduras. Son particularmente abundantes en los largos axones de las motoneuronas, donde parece que se anclan a los filamentos de actina y a los microtúbulos a través de miembros neuronales de la familia de las plaquinas. Se piensa que los neurofilamentos desempeñan un papel importante en proporcionar soporte mecánico y en estabilizar otros elementos del citoesqueleto en estas extensiones largas y delgadas de las células nerviosas.

Funciones de los filamentos intermedios: queratinas y enfermedades de la piel

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que los filamentos intermedios proporcionan un soporte estructural a

la célula, sólo recientemente se ha obtenido una evidencia directa de su función. Algunas células en cultivo no fabrican proteínas de filamentos intermedios, lo que indica que estas proteínas no se requieren para el crecimiento de las células *in vitro*. De forma similar, al inyectar anticuerpo contra vimentina en células cultivadas se disgregan las redes de filamentos intermedios sin afectar al crecimiento celular o al movimiento. Por tanto, se cree que la función principal de los filamentos intermedios consiste en conferir resistencia al citoesqueleto de las células en los tejidos de los organismos multicelulares, donde éstos están sujetos a una gran variedad de tensiones mecánicas que no afectan a las células en el ambiente aislado de una placa de cultivo.

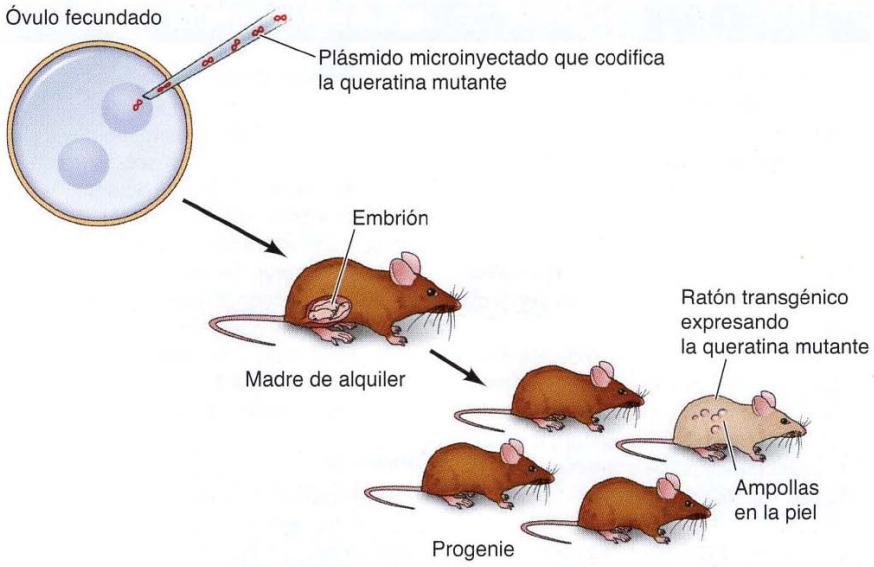


FIGURA 13.57 Demostración experimental de la función de la queratina. Un plásmido que codifica una queratina mutante que interfiere en el ensamblaje normal de los filamentos de queratina se microinyectó dentro de un pronúcleo de un huevo fecundado. El embrión microinyectado fue entonces transferido a una madre de alquiler, y algunos miembros de la descendencia incorporaron el gen de la queratina mutante en su genoma. La expresión del gen mutado en estos ratones transgénicos alteró el citoesqueleto de queratina de las células de la epidermis, dando lugar a la aparición de graves ampollas en la piel debido a lisis celular tras una tensión mecánica suave (p. ej., roce).

La evidencia experimental de tal papel *in vivo* de los filamentos intermedios se obtuvo por primera vez en 1991 mediante estudios en el laboratorio de Elaine Fuchs. Estos investigadores utilizaron ratones transgénicos para investigar los efectos *in vivo* de la expresión de un mutante de deleción de queratina, que codificaba un polipéptido incompleto que imposibilitaba que se formaran filamentos normales de queratina (**Fig. 13.57**). Este gen mutado de queratina se introdujo en los ratones transgénicos, donde fue expresado en las células basales de la epidermis e impedía la formación de un citoesqueleto de queratina normal. Este hecho desembocó en el desarrollo de alteraciones graves en la piel, incluyendo ampollas debido a lisis celular epidérmica tras un trauma mecánico suave, tal como frotarse la piel. De esta forma las alteraciones de la piel de estos ratones transgénicos supusieron un apoyo directo al supuesto papel de las queratinas en proporcionar resistencia mecánica a las células epiteliales de los tejidos. Posteriormente, se obtuvo el mismo resultado en ratones en los que el gen para la misma queratina estaba inactivado por recombinación homóloga.

Estos experimentos también apuntaron a la base molecular de una enfermedad genética humana, la epidermólisis bullosa simple (EBS). Al igual que los ratones transgénicos que expresan los genes de queratina mutante, los pacientes con esta enfermedad desarrollan ampollas en la piel como consecuencia de una lisis celular después de un trauma leve. Esta similitud condujo a realizar estudios de los genes de la queratina en los pacientes EBS, que demostraron que la EBS está causada por mutaciones en el gen de la queratina que interfieren en el ensamblaje normal de los filamentos de queratina. De esta forma, tanto los estudios experimentales en ratones transgénicos como el análisis molecular de una enfermedad genética humana han demostrado el papel de las queratinas en permitir soportar tensiones mecánicas a las células de la piel. Estudios posteriores han mostrado que las mutaciones en otras queratinas son responsables de otras enfermedades congénitas de la piel, que se caracterizan de forma similar por una fragilidad anormal en las células epidérmicas.

RESUMEN

Estructura y organización de los filamentos de actina

Ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina: Los filamentos de actina se forman por la polimerización cabeza-cola de los monómeros de actina, dando lugar a una hélice. Varias proteínas de unión a la actina regulan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos dentro de la célula.

Ver Animación 13.1

actina, microfilamento, proteína de unión a la actina, actina globular (G), actina filamentosa (F), intercambio rotatorio, citocalasina, faloidina, formina, complejo Arp2/3, profilina, tropomisina, cofilina

Organización de los filamentos de actina: Los filamentos de actina están unidos transversalmente por proteínas de unión a la actina para formar haces o redes tridimensionales.

haz de actina, red de actina, proteína formadora de haces de actina, fimbrina, haz contráctil, α-actinina, filamina

Asociación de los filamentos de actina con la membrana plasmática: Una red de filamentos de actina y de otras proteínas citoesqueléticas subyace a la membrana plasmática y determina la forma celular. Los haces de actina también se unen a la membrana plasmática y fijan a la célula en regiones de contacto célula-célula y célula-sustrato.

córtex celular, espectrina, anquirina, distrofina, integrina, adhesión focal, fibra de estrés, talina, vinculina, unión adherente, cinturón de circunferencial, cadherina, cateninas

Microvellosidades: Los filamentos de actina sostienen protuberancias permanentes de la superficie celular, como las microvellosidades y estereocilio.

microvellosidad, borde en cepillo, estereocilio, villina

Protrusiones de la superficie celular y movimiento de las células: Las protrusiones transitorias de la membrana plasmática son responsables de la fagocitosis y la locomoción de las células. La extensión de las protrusiones celulares está mediada por el crecimiento de múltiples ramas de filamentos de actina en el borde delantero de la célula. La locomoción celular es un proceso complejo en el que se forman adhesiones en los extremos de las nuevas protrusiones celulares, el cuerpo celular es empujado hacia delante por la acción de la miosina II a lo largo de fibras de estrés y el borde de cola se retrae en el cuerpo celular.

Ver Vídeos 13.1 a 13.2

pseudópodo, lamelipodio, microespina, filopodio

Motores de miosina

Contracción muscular: Los estudios en el músculo establecieron el papel de la miosina como una proteína motora que utiliza la energía derivada de la hidrólisis del ATP para generar fuerza y movimiento. La contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos de actina y miosina entre sí. La hidrólisis de ATP dirige ciclos repetidos de interacciones entre la miosina y la actina, durante los cuales, los cambios conformacionales provocan el movimiento de las cabezas de miosina a lo largo de los filamentos de actina.

Ver Animación 13.2

miosina, motor molecular, fibra muscular, miofibrilla, sarcómero, modelo de deslizamiento de los filamentos, miosina II, retículo sarcoplásmico, troponina

Asociaciones contráctiles de actina y miosina en células no musculares: Asociaciones de actina y miosina II son las responsables de diversos movimientos en las células no musculares, incluyendo la citocinesis.

citocinesis, anillo contráctil, quinasa de la cadena ligera de miosina, calmodulina

Miosinas no convencionales: Otros tipos de miosina que no actúan en la contracción sirven para el transporte de vesículas de membrana y orgánulos a lo largo de los filamentos de actina.

miosina no convencional

Microtúbulos

Estructura, ensamblaje e inestabilidad dinámica de los microtúbulos: Los microtúbulos se forman por la polimerización reversible de la tubulina. Muestran inestabilidad dinámica y sufren ciclos continuos de ensamblaje y desensamblaje como resultado de la hidrólisis de GTP tras la polimerización de la tubulina.

Ver Animación 13.3

microtúbulo, tubulina, inestabilidad dinámica, colchicina, colcemida, vincristina, vinblastina, taxol, proteína asociada a los microtúbulos (MAP)

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Ensamblaje de microtúbulos: En la mayoría de las células animales los microtúbulos se extienden desde un centro organizador de microtúbulos, o centrosoma, localizado cerca del centro de la célula. El centrosoma generalmente está constituido por un par de centríolos rodeados por el material pericentriolar. El crecimiento de los microtúbulos se inicia en el material pericentriolar, que así sirve para anclar sus extremos «menos».

centrosoma, centro de organización de microtúbulos, complejo del anillo de γ-tubulina, centríolo, material pericentriolar

Organización de los microtúbulos en el interior celular: La estabilización selectiva de los microtúbulos por modificación post-traduccional de la tubulina y la unión de proteínas asociadas a microtúbulos puede determinar la forma y la polaridad celular, así como la extensión de axones y dendritas de las células nerviosas.

Motores microtubulares y movimientos

Identificación de proteínas motoras microtubulares: Dos familias de proteínas motoras, las quinesinas y las dineínas, son las responsables del movimiento de la quinesia a lo largo de los microtúbulos. La mayoría de las proteínas relacionadas con la quinesina se desplazan en dirección al extremo «más», mientras que las dineínas y algunos miembros de la familia de la quinesina se mueven hacia los extremos «menos» de los microtúbulos.

quinesina, dineína, dineína axonémica, microscopia vídeo amplificada, dineína citoplasmática, dinactina

Ver Animación 13.4

Transporte de mercancías y organización intracelular: El movimiento a lo largo de los microtúbulos transporta vesículas de membrana y orgánulos a través del citoplasma, al igual que coloca los orgánulos citoplasmáticos en la célula.

Ver Vídeos 13.4 y 13.5

Cilios y flagelos: Los cilios y flagelos son extensiones de la membrana plasmática mantenidas por microtúbulos. Sus movimientos se producen por el deslizamiento de los microtúbulos, dirigido por la acción de motores de dineína.

cilio, flagelo, axonema, nexina, cuerpo basal

Ver Vídeos 13.6 a 13.8

Reorganización de microtúbulos durante la mitosis: Los microtúbulos se reorganizan al principio de la mitosis para formar el huso acromático, que es responsable de la separación cromosómica.

huso acromático, microtúbulo cinetocórico, microtúbulo cromosómico, microtúbulo interpolar, microtúbulo astral

Movimiento cromosómico: Los cromosomas duplicados se alinean sobre la placa metafásica. Durante la anafase de la mitosis, los cromosomas hijos se separan y migran a polos opuestos del huso mitótico.

anafase A, anafase B

Filamentos intermedios

Proteínas de filamentos intermedios: Los filamentos intermedios son polímeros de más de 70 proteínas diferentes que se expresan en varios tipos de células. No están implicados en el movimiento celular pero crean un armazón en el que pueden tener lugar diversos procesos celulares y proporcionan apoyo mecánico a las células y tejidos.

filamento intermedio, queratina, vimentina, desmina, proteína de neurofilamentos (NF)

Ensamblaje de filamentos intermedios: Los filamentos intermedios se forman a partir de dímeros de dos cadenas polipeptídicas enrolladas una sobre otra en una estructura de hélice enrollada. Estos dímeros se asocian para formar tetrámeros, que se ensamblan en protofilamentos. Los filamentos intermedios están constituidos por protofilamentos enrollados uno sobre otro en una estructura a modo de cuerda.

Organización intracelular de los filamentos intermedios: Los filamentos intermedios forman una red que se extiende desde un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática de la mayoría de las células. En las células epiteliales los filamentos intermedios se unen a la membrana plasmática en regiones de contactos celulares especializados (desmosomas y hemidesmosomas). Los filamentos intermedios también tienen una función especializada en el músculo y en las células nerviosas.

desmosomas, hemidesmosomas, plaquina

RESUMEN

Funciones de los filamentos intermedios: queratinas y enfermedades de la piel: La importancia de los filamentos intermedios como estructuras que proporcionan fuerza mecánica a las células en los tejidos ha sido demostrada mediante experimentos de introducción de genes de queratina mutados en ratones transgénicos. Mutaciones similares en los genes de la queratina son responsables de algunas enfermedades humanas de la piel.

PALABRAS CLAVE

Preguntas

1. ¿Por qué los filamentos de actina poseen una marcada polaridad? ¿Por qué es la polaridad de los filamentos de actina importante para la contracción muscular?
2. ¿Cómo afectarían la citocalasina y la faloidina al *treadmilling* de los filamentos de actina?
3. ¿Cómo regulan el ensamblaje y renovación de filamentos de actina la ADF/cofilina, la profilina y el complejo Arp2/3?
4. ¿Qué bandas o zonas de un sarcómero muscular modifican la longitud durante la contracción? ¿Por qué la banda A no cambia de longitud?
5. ¿Cómo regula el Ca^{2+} la contracción de las células del músculo liso?
6. ¿Qué observación clave ayudó a Vale y colaboradores a diseñar una estrategia para el aislamiento de la quinesina?
7. Estás estudiando el transporte de vesículas secretoras que contienen insulina a lo largo de los microtúbulos en un cultivo de células pancreáticas. ¿Cómo afectaría el tratamiento con colcemida al transporte de estas vesículas?
8. ¿Cuál es la función celular de la γ-tubulina?
9. ¿Cómo afectaría la expresión de siARN dirigidos frente a la vimentina al crecimiento de fibroblastos en cultivo?
10. ¿Por qué los filamentos intermedios apolares, aunque se ensamblen a partir de monómeros, poseen extremos diferentes?
11. ¿Cómo afectaría al movimiento de los cilios la eliminación de la nexina?

Bibliografía

Estructura y organización de los filamentos de actina

Baines, A. J., H.-C. Lu and P. M. Bennett 2013. The protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 605-619. [R]

Bravo-Cordero, J. J., M. A. O. Magalhaes, R. J. Eddy, L. Hodgson and J. Condeelis. 2013. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 405-415. [R]

Breitsprecher, D. and B. L. Goode. 2013. Formins at a glance. *J. Cell Sci.* 126: 1-7. [R]

Campellone, K. G. and M. D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 237–251. [R]

Dominguez, R. and K. C. Holmes. 2011. Actin structure and function. *Ann. Rev. Biophys.* 40: 169–186. [R]

Fehon, R. G., A. I. McClatchey and A. Bretscher. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 276–287. [R]

Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37–44. [P]

Ozyamak, E., J. M. Kollman and A. Komeili. 2013. Bacterial actins and their diversity. *Biochemistry* 52: 6928-6939. [R]

Pollard, T. D. and J. A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208–1212. [R]

Rahimov, F. and L. M. Kunkcl. 2013. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 201: 499–510. [R]

Ridley, A. J. 2011. Life at the leading edge. *Cell* 145: 1012–1022. [R]

Rotty, J. D., C. Wu and J. E. Bear. 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 7–12. [R]

Yonemura, S. 2011. Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:515–522. [R]

Zhou, A. X., J. H. Hartwig and L. M. Akyurek. 2010. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* 20: 113–123. [R]

Motor de miosina

Finer, J. T., R. M. Simmons and J. A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368: 113–119. [P]

Geeves, M. A. and K. C. Holmes. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 687–728. [R]

Greenberg, M. J. and E. M. Ostap. 2013. Regulation and control of myosin-I by the motor and light chain binding domains. *Trends Cell Biol.* 23: 81–89. [R]

Hammer, J. A. III and W. Wagner. 2013. Functions of class V myosins in neurons. *J. Biol. Chem.* 288: 28428–28434. [R]

Hartman, M. A., D. Finan, S. Sivaramakrishnan and J. A. Spudich. 2011. Principles of unconventional myosin function and targeting. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 133–155. [R]

Huxley, A. F. and R. Niedergerke. 1954. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173: 971–973. [P]

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscle contraction. *Science* 164: 1356–1366. [R]

Huxley, H. E. and J. Hanson. 1954. Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation. *Nature* 173: 973–976. [P]

Kull, F. J. and S. A. Endow. 2013. Force generation by kinesin and myosin cytoskeletal motor proteins. *J. Cell Sci.* 126: 9–19. [R]

Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Kolmes and R. A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58–65. [P]

Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg and H. M. Holden. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261: 50–58. [P]

Sweeney, H. L. and A. Houdusse. 2010. Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* 141: 573–582. [R]

Microtúbulos

Akhmanova, A. and M. O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 309–322. [R]

Al-Bassam, J. and F. Chang. 2011. Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol.* 21: 604–614. [R]

Bornens, M. 2012. The centrosome in cells and organisms. *Science* 335: 422–426. [R]

Gonczy, P. 2012. Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 425–435. [R]

Howard, J. and A. A. Hyman. 2009. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 569–574. [R]

Janke, C. and J. C. Bulinski. 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 773–785. [R]

Kueh, H. Y. and T. J. Mitchison. 2009. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science* 325: 960–963. [R]

Mennella, V., D. A. Agard, B. Huang and L. Pelletier. 2014. Amorphous no more: subdiffraction view of the pericentriolar material architecture. *Trends Cell Biol.* 24: 188–197. [R]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237–242. [P]

Nogales, E., M. Whittaker, R. A. Milligan and K. H. Downing. 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96: 79–88. [P]

Osborn, M. and K. Weber. 1976. Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 867–871. [P]

Wasteneys, G. O. and J. C. Ambrose. 2009. Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19: 62–71. [R]

Motores microtubulares y movimientos

Bettencourt-Dias, M., F. Hildebrandt, D. Pellman, G. Woods and S. A. Godinho. 2011. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet.* 27: 307–315. [R]

Brady, S. T. 1985. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal motor. *Nature* 317: 73–75. [P]

Brady, S. T., R. J. Lasek and R. D. Allen. 1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218: 1129–1131. [P]

Cross, R. A. and A. McAinsh. 2014. Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 257–271. [R]

Gennerich, A. and R. D. Vale. 2009. Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 59–67. [R]

Gibbons, I. R. and A. Rowe. 1965. Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149: 424–426. [P]

Hammond, J. W., D. Cai and K. J. Verhey. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 71–76. [R]

Hirokawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka and S. Niwa. 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 682–696. [R]

Kardon, J. R. and R. D. Vale. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 854–864. [R]

Lasek, R. J. and S. T. Brady. 1985. Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316: 645–647. [P]

Lüders, J. and T. Stearns. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 161–167. [R]

Marx, A., A. Hoenger and E. Mandelkow. 2009. Structures of kinesin motor proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66: 958–966. [R]

Nigg, E. A. and T. Stearns. 2011. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature Cell Biol.* 13: 1154–1160. [R]

Pedersen, L. B., I. R. Veland, J. M. Schroder and S. T. Christensen. 2008. Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn.* 237: 1993–2006. [R]

Roberts, A. J., T. Kon, P. J. Knight, K. Sutoh and S. A. Burgess. 2013. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 713-726. [R]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154–157. [R]

Scholey, J. M., I. Brust-Mascher and A. Mogilner. 2003. Cell division. *Nature* 422: 746–752. [R]

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467–480. [R]

Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39–50. [P]

Filamentos intermedios

Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller and E. Fuchs. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell* 66: 1301–1311. [P]

Epstein, E. H., Jr., J. M. Bonifas, and A. L. Rothman. 1991. Epidermolysis bullosa simplex: Evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254: 1202–1205. [P]

Fuchs, E. and D. W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279: 514–519. [R]

Godsel, L. M., R. P. Hobbs and K. J. Green. 2008. Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Tends Cell Biol.* 18: 28–37. [R]

Goldfarb, L. G. and M. C. Dalakas. 2009. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J. Clin. Invest* 119: 1806–1813. [R]

Graumann, P. L. 2007. Cytoskeletal elements in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 61: 589–618. [R]

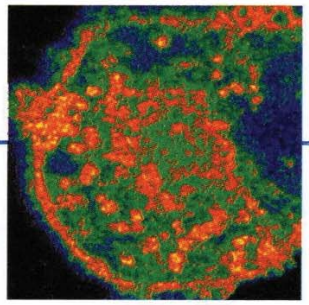
Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S. V. Strelkov and U. Aebi. 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 562–573. [R]

Kim, S. and P. A. Coulombe. 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* 21: 1581–1597. [R]

Snider, N. T. and M. B. Omary, 2014. Post-translation modifications of intermediate filament proteins: Mechanisms and functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 163–177. [R]

Suozzi, K. C., X. Wu and E. Fuchs. 2012. Spectraplakins: Master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *J. Cell Biol.* 197: 465–475. [R]

Wiche, G. and L. Winter. 2011. Plectin isoforms as organizers of intermediate filament cytoarchitecture. *Bioarchitecture.* 1: 14–20. [R]



Capítulo 14

Membrana plasmática

Estructura de la membrana plasmática 531

Transporte de moléculas pequeñas 544

Endocitosis 560

MEDICINA MOLECULAR:
Fibrosis quística 557

EXPERIMENTO CLAVE:
Receptor de las LDL 564

Todas las células —tanto procariotas como eucariotas— están rodeadas por la membrana plasmática, que define el límite de la célula y separa su contenido interno del medio externo. Debido a que actúa como una barrera selectiva al paso de las moléculas, la membrana plasmática determina la composición del citoplasma. En último término esto define la identidad de la célula, por lo que la membrana plasmática es una de las estructuras más importantes de la evolución celular. De hecho, como se estudió en el Capítulo 1, se cree que la primera célula surgió al quedar rodeado un ARN autorreplicante por una membrana de fosfolípidos.

La estructura básica de la membrana plasmática de las células modernas es la bicapa lipídica, que es impermeable a la mayoría de las moléculas hidrosolubles. Por tanto, el paso de iones y de la mayor parte de las moléculas orgánicas a través de la membrana plasmática es mediado por proteínas, que son las responsables del tráfico selectivo de las moléculas tanto al interior como al exterior celular. Otras proteínas de la membrana plasmática controlan las interacciones entre las células de los organismos multicelulares y actúan como sensores a través de los cuales la célula recibe señales del medio. Por tanto, la membrana plasmática desempeña un papel doble: aísla al citoplasma e igualmente media las interacciones entre la célula y su medio.

Estructura de la membrana plasmática

Como todas las demás membranas celulares, la membrana plasmática está constituida por lípidos y proteínas. La estructura fundamental de la membrana es la bicapa lipídica, que forma una barrera estable entre dos compartimentos acuosos. En el caso de la membrana plasmática estos compartimentos son el interior y el exterior celular. Las proteínas embebidas dentro de la bicapa lipídica llevan a cabo las funciones específicas de la membrana plasmática, incluyendo el transporte selectivo de moléculas y el reconocimiento intercelular.

Bicapa lipídica

La membrana plasmática es la membrana que se ha estudiado más a fondo de todas las membranas celulares, y la concepción actual que tenemos de la estructura de las membranas se debe, en gran medida, a las investigaciones sobre la membrana plasmática. Las membranas plasmáticas de los glóbulos rojos sanguíneos de los mamíferos (eritrocitos) han sido particularmente útiles como modelo para el estudio de la estructura de las membranas. Los glóbulos rojos de los mamíferos no contienen núcleo ni membranas internas, por lo que representan una fuente a partir de la cual aislar fácilmente

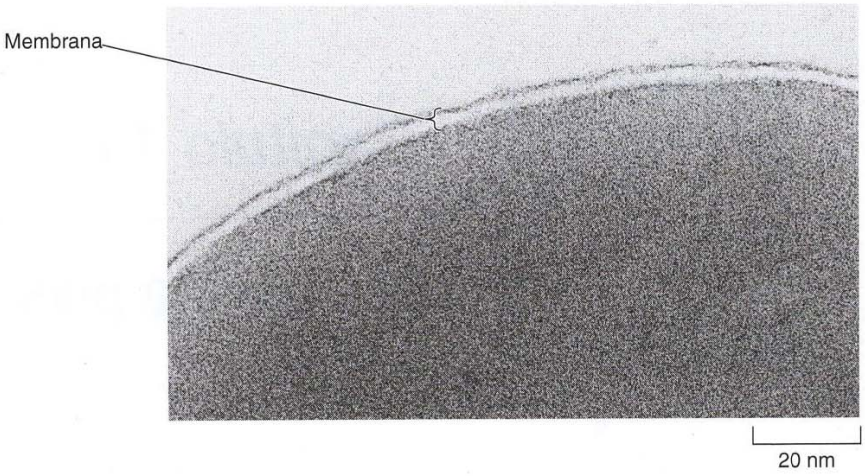


FIGURA 14.1 Estructura en bicapa de la membrana plasmática. Micrografía electrónica de un glóbulo rojo humano. Obsérvese la apariencia de «vía de tren» de la membrana plasmática. (Cortesía de J. David Robertson, Duke University Medical Center.)

las membranas plasmáticas puras para su análisis bioquímico. De hecho, los estudios sobre la membrana plasmática de los glóbulos rojos proporcionaron la primera evidencia de que las membranas biológicas estaban constituidas por una bicapa lipídica. En 1925, dos científicos holandeses (E. Gorter y R. Grendel) extrajeron los lípidos de membrana de un número conocido de glóbulos rojos, que se correspondían a una superficie conocida de membrana plasmática. Entonces determinaron la superficie ocupada por una única capa de los lípidos extraídos, al extenderlos sobre una interfase aire-agua. La superficie ocupada por la monocapa lipídica resultó ser el doble de la ocupada por las membranas plasmáticas eritrocíticas, lo que llevó a la conclusión de que las membranas estaban constituidas por bicapas lipídicas en lugar de por monocapas.

La estructura en bicapa de la membrana plasmática de los eritrocitos se pone de manifiesto claramente mediante micrografías electrónicas de elevado aumento (**Fig. 14.1**). La membrana plasmática aparece como dos líneas densas separadas por un espacio intermedio —una morfología referida frecuentemente como apariencia de «vía de ferrocarril»—. Esta imagen se obtiene debido a la unión de los metales pesados electrodensos, empleados como tinción en la microscopia electrónica de transmisión (véase Cap. 1), sobre las cabezas polares de los fosfolípidos que de esta manera aparecen como líneas oscuras. Estas líneas densas están separadas por la porción interna de la membrana, teñida muy ligeramente, que contiene las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas.

Como se describió en el Capítulo 2, las membranas de las células animales contienen cuatro fosfolípidos principales (**fosfatidilcolina**, **fosfatidiletanolamina**, **fosfatidilserina**, **fosfatidilinositol** y **esfingomielina**), que juntos constituyen aproximadamente el 50% de los lípidos en la mayoría de las membranas (**Tabla 14.1**). Estos fosfolípidos se distribuyen de manera asimétrica entre las dos mitades de la bicapa de la membrana (**Fig. 14.2**). La capa externa de la membrana plasmática está compuesta principalmente por fosfatidilcolina y esfingomielina, mientras que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina son los fosfolípidos predominantes de la capa interna. Como se indica en el Capítulo 11, la esfingomielina se sintetiza en la superficie luminal de la membrana de Golgi, que determina su posición en el lado extracelular (capa externa) de la membrana plasmática. Sin embar-

TABLA 14.1 Composición lipídica de la membrana plasmática

Lípido	Porcentaje molar
Fosfatidilcolina	20
Fosfatidiletanolamina	11
Fosfatidilserina	4
Fosfatidilinositol	2
Colesterol	49
Esfingomielina	13
Glicolípidos	1

Los datos corresponden a células de mamíferos de G. van Meer, D. R. Voelker and G. W. Feigenson. 2008. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112.

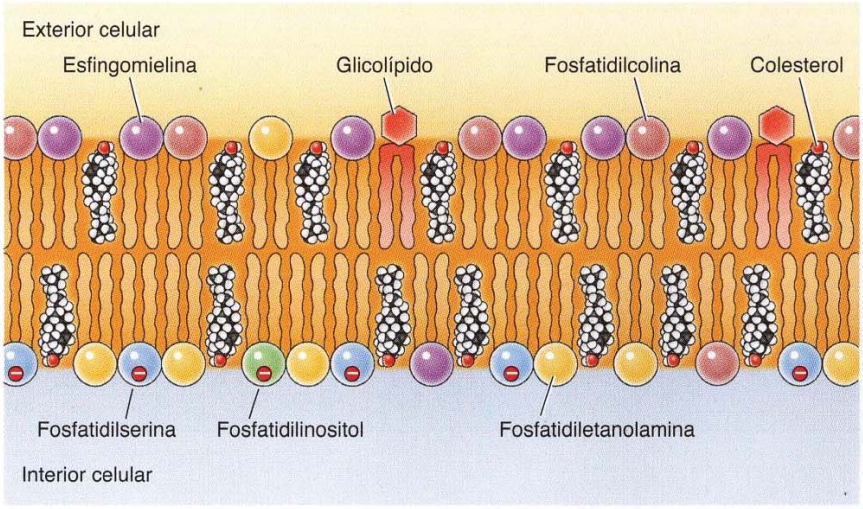


FIGURA 14.2 Componentes lipídicos de la membrana plasmática. La capa externa está constituida predominantemente por fosfatidilcolina, esfingomielina y glicolípidos, mientras que la capa interna contiene fosfatidil etanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. El colesterol se distribuye en ambas capas. Se indica la carga neta negativa de las cabezas de fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Las estructuras de fosfolípidos, glicolípidos y colesterol se muestran en las Figuras 2.7, 2.8 y 2.9, respectivamente.

go, los otros fosfolípidos se sintetizan en el retículo endoplásmico, donde se distribuyen de manera simétrica en los lados citosólico y luminal de la membrana (véase Fig. 11.22). Las orientaciones asimétricas de estos fosfolípidos en la membrana plasmática son establecidas por transportadores que translocan selectivamente fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina en la capa interna y fosfatidilcolina en la capa externa. El grupo delantero de fosfatidilserina tiene carga negativa, con lo cual su predominio en la capa interna produce una carga neta negativa en la cara citosólica de la membrana plasmática. Debe observarse también que la localización de fosfatidilserina en la capa interna desempeña un papel importante en la muerte celular programada, como se verá en el Capítulo 18.

Además de los fosfolípidos, las membranas plasmáticas de las células animales contienen **glicolípidos** y **colesterol**. Los glicolípidos se encuentran exclusivamente en la capa externa de la membrana plasmática, con sus residuos hidrocarbonados expuestos a la superficie celular, tal como se determina por su síntesis en el Golgi. Son componentes relativamente minoritarios, constituyendo sólo una pequeña proporción de los lípidos de la mayor parte de las membranas plasmáticas. El colesterol, por el contrario, es un componente mayoritario de las membranas plasmáticas de las células animales, estando presente en casi las mismas cantidades molares que los fosfolípidos. El colesterol tiene una rígida estructura en anillo (véase Fig. 2.9) que se inserta en una bicapa de fosfolípidos con su grupo hidroxilo polar cerca de los grupos delanteros de fosfolípidos (véase Fig. 14.2). Como presenta una mayor afinidad por la esfingomielina que por los otros fosfolípidos, está más concentrado en la capa externa. Las bacterias y las células vegetales no contienen colesterol, sino compuestos relacionados (esteroles o lípidos de tipo esterol) que realizan una función similar.

Dos características generales de las bicapas lipídicas resultan críticas para la función de la membrana. Primero, la estructura de los fosfolípidos es la responsable de la actuación de las membranas como barreras entre dos compartimentos acuosos. Debido a que el interior de la bicapa lipídica está ocupado por cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas, la membrana es impermeable a moléculas hidrosolubles, incluyendo iones y la mayoría de las moléculas biológicas. Segundo, las bicapas de los fosfolípidos que se encuentran en la naturaleza son fluidos viscosos, no sólidos. Los ácidos grasos de la mayor parte de los fosfolípidos naturales tienen uno o más enlaces dobles, que introducen codos en las cadenas hidrocarbonadas y dificultan su empaquetamiento. Por tanto, las largas cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos se mueven li-

◆ Durante la muerte celular programada, la fosfatidilserina se transloca en la capa externa de la membrana plasmática, donde señaliza la eliminación de las células en final de vida por fagocitosis (véase Capítulo 18).

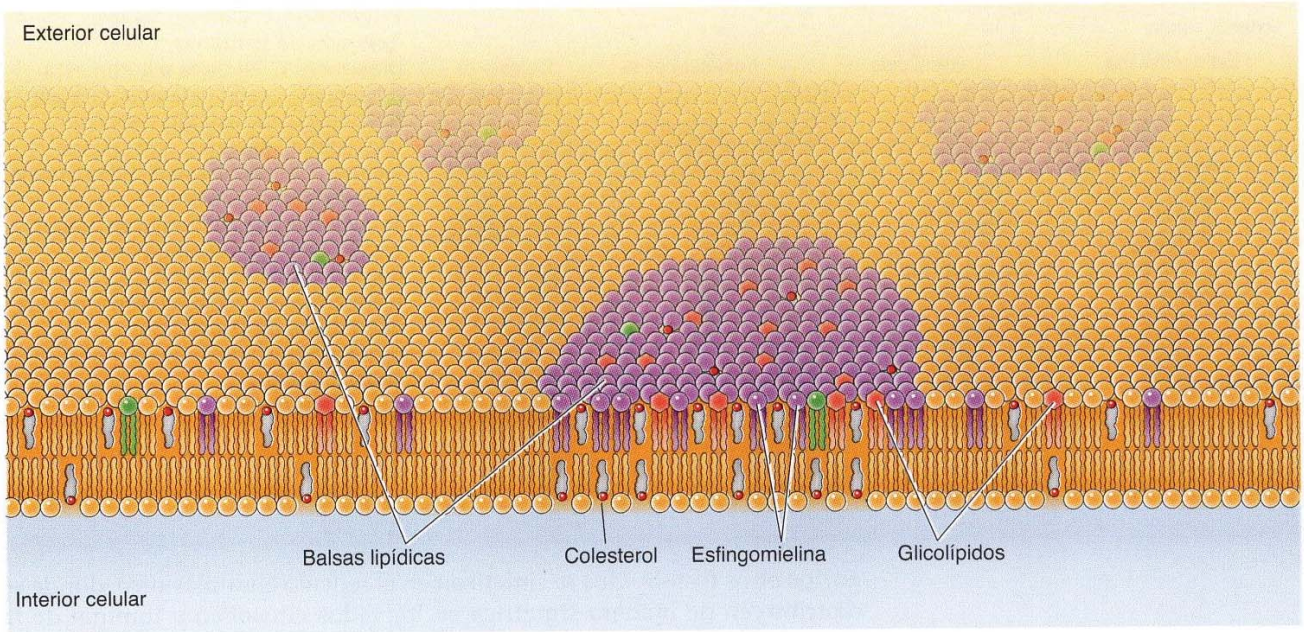


FIGURA 14.3 Balsas lipídicas. Las balsas lipídicas se forman como consecuencia de las interacciones entre esfingomielina, glicolípidos y colesterol.

bremente en el interior de la membrana, por lo que la membrana es ligera y flexible. Además, tanto los lípidos como las proteínas son capaces de difundir lateralmente dentro de la membrana —una propiedad fundamental para muchas de las funciones de la membrana.

Como se indica en el Capítulo 2, el colesterol tiene efectos importantes en la fluidez de la membrana. Además, interviene en la formación de dominios de membrana que actúan como mediadores en la agrupación de diversas proteínas en la membrana plasmática. En lugar de difundir libremente en la membrana plasmática, el colesterol y los esfingolípidos (esfingomielina y glicolípidos) tienden a agregarse en pequeñas placas semisólidas conocidas como **balsas lipídicas** (**Fig. 14.3**). Como se verá más adelante en este capítulo, las balsas lipídicas desempeñan un cometido importante en la compartimentalización de la membrana plasmática en dominios funcionales discretos.

Proteínas de membrana plasmática

Mientras los lípidos son los elementos estructurales fundamentales de las membranas, las proteínas son las responsables de realizar las funciones específicas de la misma. La mayor parte de las membranas plasmáticas están compuestas por, aproximadamente, un 50% de lípidos y un 50% de proteínas en peso, constituyendo las fracciones hidrocarbonadas de los glicolípidos y glicoproteínas de un 5% a un 10% de la masa de la membrana. Como las proteínas son mucho más grandes que los lípidos, este porcentaje corresponde a casi una molécula de proteína por cada 50 o 100 moléculas de lípidos.

En 1972, Jonathan Singer y Garth Nicolson propusieron el **modelo del mosaico fluido** de la estructura de membrana, en el cual las membranas se contemplan como fluidos bidimensionales con proteínas introducidas en las bicapas lipídicas (**Fig. 14.4**). Una de las características principales del modelo del mosaico fluido es que, debido a su inserción en una bicapa lipídica fluida, las proteínas y los lípidos pueden difundirse en sentido lateral a

VÍDEO 14.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v14.1

Fluidez de la membrana. La membrana plasmática está compuesta por una bicapa lipídica fluida.

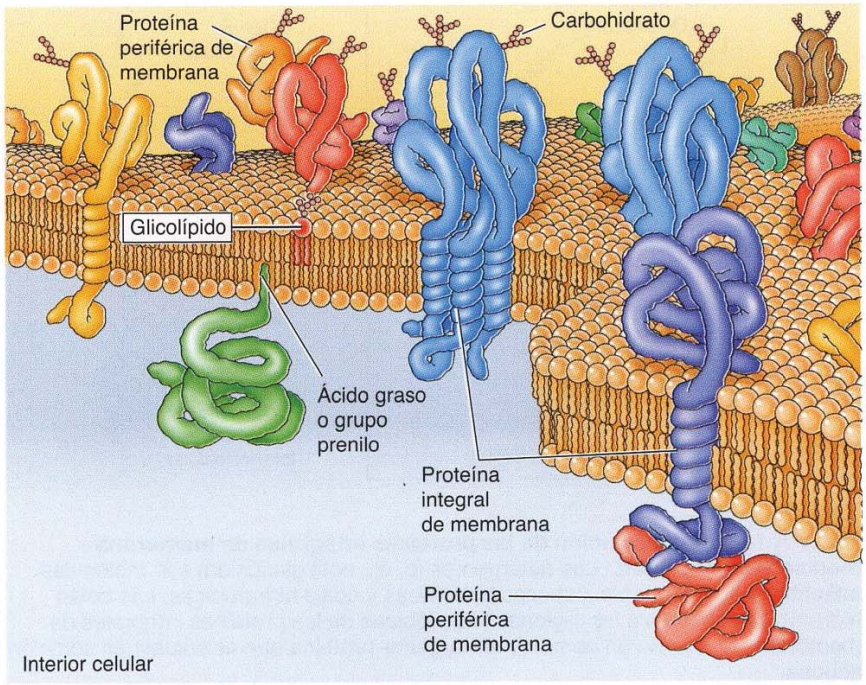


FIGURA 14.4 Modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática. Las proteínas integrales de membrana se insertan dentro de la bicapa lipídica, mientras que las proteínas periféricas se fijan a la membrana indirectamente mediante interacciones proteína-proteína. La mayoría de las proteínas integrales de membrana es proteína transmembrana, con porciones expuestas a ambos lados de la bicapa lipídica. La parte extracelular de estas proteínas aparece generalmente glicosilada, al igual que las proteínas periféricas de membrana unidas a la cara externa de la misma.

través de la membrana. Este movimiento lateral de proteínas de membrana fue descrito directamente por Larry Frye y Michael Edidin en 1970. Frye y Edidin fusionaron células humanas y de ratón en cultivo para producir híbridos de células humanas-murinas (**Fig. 14.5**). Después analizaron la distribución de proteínas en las membranas de estas células híbridas usando anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas de origen humano y murino. Estos anticuerpos fueron marcados con distintos tintes fluorescentes, para poder distinguir las proteínas humanas y murinas mediante microscopia de fluorescencia. En un lapso de 40 minutos después de la fusión, las proteínas murinas y humanas se entremezclaron en la superficie de células híbridas, lo que indica que se movieron libremente a través de la membrana plasmática. El modelo del mosaico fluido se mantiene como el paradigma básico para la organización de todas las membranas biológicas, aunque hoy se reconoce que la membrana plasmática está compuesta por varios dominios especializados, que se abordarán en el siguiente apartado.

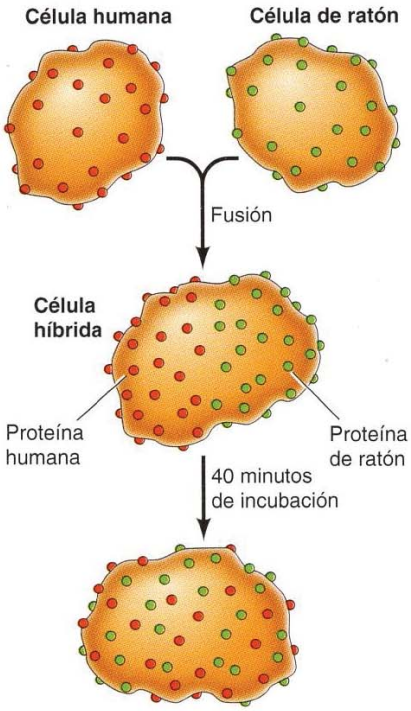


FIGURA 14.5 Movilidad de las proteínas de la membrana. Se fusionaron células de hombre y de ratón para obtener células híbridas. La distribución de las proteínas en la superficie celular se analizó utilizando anticuerpos anti-humano y anti-ratón marcados con diferentes tintes fluorescentes (rojo y verde, respectivamente). Las proteínas humanas y murinas se han entremezclado sobre la superficie de la célula después de 40 minutos de incubación.

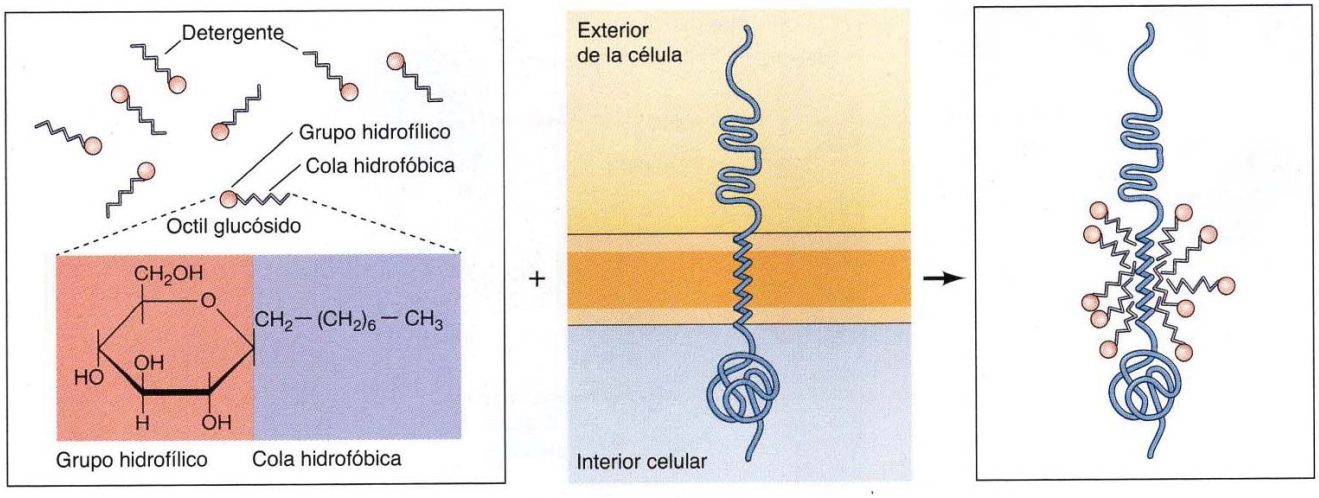


FIGURA 14.6 Solubilización de las proteínas integrales de membrana mediante detergentes. Los detergentes (p. ej., octil glucósido) son moléculas anfipáticas que contienen cabezas hidrofílicas y colas hidrofóbicas. Las colas hidrofóbicas se unen a las regiones hidrofóbicas de las proteínas integrales de membrana, formando un complejo detergente-proteína que es soluble en solución acuosa.

Singer y Nicolson distinguieron dos clases de proteínas asociadas a la membrana, a las que denominaron **proteínas periféricas** e **integrales de membrana**. Las proteínas periféricas de membrana se definieron operativamente como proteínas que se disociaban de la membrana tras el tratamiento con agentes polares, como soluciones de pH extremo o de alta concentración salina, que no rompen la bicapa fosfolipídica. Una vez disociadas de la membrana, las proteínas periféricas de membrana son solubles en tampones acuosos. Estas proteínas no se insertan en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. En vez de esto, se asocian indirectamente con las membranas a través de interacciones proteína-proteína. Estas interacciones frecuentemente implican enlaces iónicos, que se ven afectados por el pH extremo o la alta salinidad.

A diferencia de las proteínas periféricas de membrana, las proteínas integrales de membrana solamente pueden ser liberadas mediante tratamientos que rompan la bicapa fosfolipídica. Estas proteínas integrales de membrana tienen partes que se insertan dentro de la bicapa lipídica, por lo que sólo pueden ser disociadas mediante agentes que alteren las interacciones hidrofóbicas. Los agentes más comunes utilizados para la solubilización de las proteínas integrales de membrana son los detergentes, que son moléculas pequeñas anfipáticas que contienen tanto grupos hidrofóbicos como hidrofílicos (**Fig. 14.6**). Las porciones hidrofóbicas de los detergentes desplazan los lípidos de membrana y se unen a las porciones hidrofóbicas de las proteínas integrales de membrana. Debido a que el otro extremo de la molécula de detergente es hidrofílico, los complejos detergente-proteína son solubles en soluciones acuosas.

Muchas proteínas integrales son **proteínas transmembrana**, que atraviesan la bicapa lipídica con partes expuestas a ambos lados de la membrana. Estas proteínas se pueden observar en las micrografías electrónicas de las membranas plasmáticas preparadas mediante la técnica de criofractura (véase Fig. 1.37). En estas muestras, la membrana se encuentra partida y se-

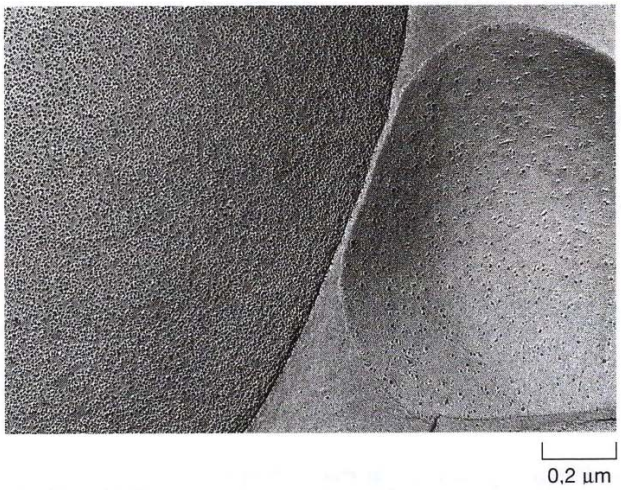


FIGURA 14.7 Micrografía electrónica de criofractura de membranas de glóbulos rojos sanguíneos humanos. Las partículas en la membrana son proteínas transmembrana.

parada en sus dos capas. Las proteínas transmembrana aparecen entonces como partículas sobre la cara interna de la membrana (**Fig. 14.7**).

La porción de las proteínas transmembrana que atraviesa la membrana son generalmente α-hélices de 20 a 25 aminoácidos hidrofóbicos que se insertan dentro de la membrana del retículo endoplasmático durante la síntesis de la cadena polipeptídica (véanse Figs. 11.12-11.15). Estas proteínas entonces se transportan en vesículas de membrana desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, y desde allí a la membrana plasmática. A las cadenas polipeptídicas se les añaden grupos carbohidrato, tanto en el retículo endoplasmático como en el aparato de Golgi, por lo que la mayoría de las proteínas transmembrana de la membrana plasmática son glicoproteínas con sus oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula.

Los estudios en glóbulos rojos han proporcionado buenos ejemplos de proteínas periféricas e integrales asociadas con la membrana plasmática. Las membranas de los eritrocitos humanos contienen cerca de una docena de proteínas principales, que se identificaron originalmente mediante electroforesis en gel de preparaciones de membrana. La mayor parte de éstas son proteínas periféricas de membrana que se han identificado como componentes del citoesqueleto cortical, que subyace a la membrana plasmática y determina la forma celular (véase Cap. 13). Por ejemplo, la proteína periférica de membrana más abundante de los glóbulos rojos es la espectrina, que es la principal proteína del citoesqueleto de los eritrocitos (véase Fig. 13.13). Otras proteínas periféricas de membrana de los glóbulos rojos son la actina, la anquirina y la banda 4.1. La anquirina es el principal puente de unión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, uniéndose a la espectrina y a la proteína integral de membrana banda 3. Un nexo adicional entre la membrana y el citoesqueleto lo proporciona la banda 4.1, que se fija a las uniones de espectrina y actina, así como a la glicoforina (la otra proteína integral de membrana importante de los eritrocitos).

Las dos proteínas integrales de membrana principales de los glóbulos rojos, glicoforina y banda 3, proporcionan ejemplos bien estudiados de la estructura de las proteínas transmembrana (**Fig. 14.8**). La glicoforina es una glicoproteína pequeña de 131 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 30.000 que atraviesa la membrana mediante una única α-héli-

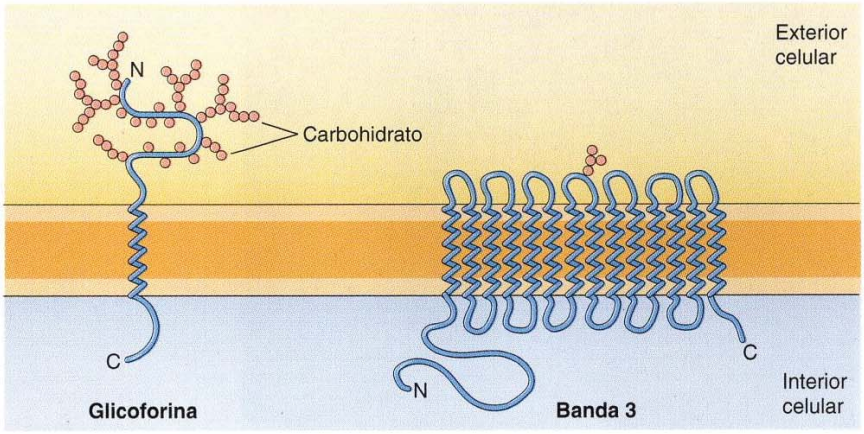


FIGURA 14.8 Proteínas integrales de membrana de glóbulos rojos sanguíneos. La glicoforina es un dímero, donde cada cadena de polipéptidos contiene 131 aminoácidos y una única α-hélice transmembrana. Está muy glicosilada, con 16 sitios de unión para los oligosacáridos en la porción extracelular de la cadena polipeptídica. La banda 3 (929 aminoácidos) tiene múltiples α-hélices transmembrana y atraviesa la membrana 14 veces.

ce de 23 aminoácidos. Está fuertemente glicosilada y contiene aproximadamente el 50% de carbohidratos, con la parte amino-terminal glicosilada de la cadena de polipéptidos expuesta a la superficie celular. La otra proteína transmembrana importante de los eritrocitos, banda 3, es el transportador de aniones responsable del paso de los iones de bicarbonato (HCO_3^-) y cloruro (Cl^-) a través de la membrana eritrocitaria. La cadena polipeptídica de la banda 3 consta de 929 aminoácidos con 14 regiones en α-hélice que atraviesan la membrana. Dentro de la membrana, dímeros de la banda 3 forman estructuras globulares que contienen canales internos a través de los cuales los iones son capaces de cruzar la bicapa lipídica.

Debido a su carácter anfipático y la necesidad de detergentes para su aislamiento, es muy difícil conseguir que las proteínas transmembrana cristalicen, como se requiere para un análisis estructural tridimensional por difracción de rayos X. Sin embargo, se han obtenido avances en este campo y en la actualidad se han determinado más de 400 proteínas de membrana. La primera proteína transmembrana en ser analizada por cristalografía de rayos X fue el centro de reacción fotosintético de la bacteria *Rhodopseudomonas viridis*, cuya estructura fue publicada en 1985 (**Fig. 14.9**). El centro de reacción está constituido por tres proteínas transmembrana, designadas por L, M y H, (del inglés *light*, *medium* y *heavy*, ligera, media y pesada, respectivamente) en función de su tamaño aparente indicado por electroforesis en gel. Las subunidades L y M tienen cada una cinco α-hélices que atraviesan la membrana. La subunidad H tiene únicamente una α-hélice transmembrana y la mayor parte de la cadena polipeptídica se dispone sobre el lado citosó-

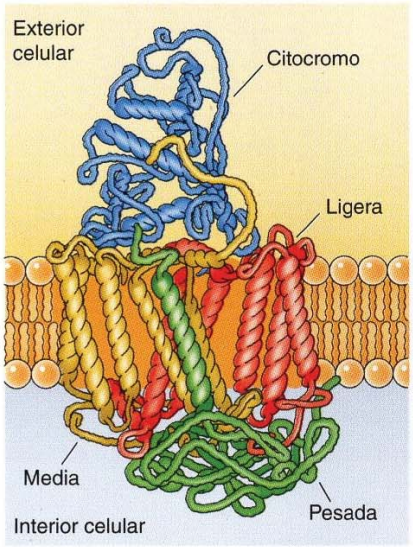


FIGURA 14.9 Centro de reacción fotosintético de una bacteria. El centro de reacción de *Rhodopseudomonas viridis* consta de tres proteínas transmembrana, denominadas ligera (roja), media (marrón) y pesada (verde). Las subunidades L y M cada una tiene cinco α-hélices transmembrana, mientras que la subunidad H solamente tiene una. La cuarta subunidad del centro de reacción es un citocromo (azul), que es una proteína periférica de membrana.

lico de la membrana. La cuarta subunidad del centro de reacción es un citocromo, que es una proteína periférica de membrana unida al complejo mediante interacciones proteína-proteína.

A diferencia de las proteínas transmembrana, otros tipos de proteínas (algunas de las cuales se comportan como proteínas integrales de membrana) se unen a la membrana plasmática por uniones covalentes a lípidos o a glicolípidos (**Fig. 14.10**). Una clase de estas proteínas se unen a la capa externa de la membrana plasmática mediante **anclajes de glicosilfosfatidilinositol** (**GPI**). Los anclajes de GPI se añaden a determinadas proteínas que se trans-

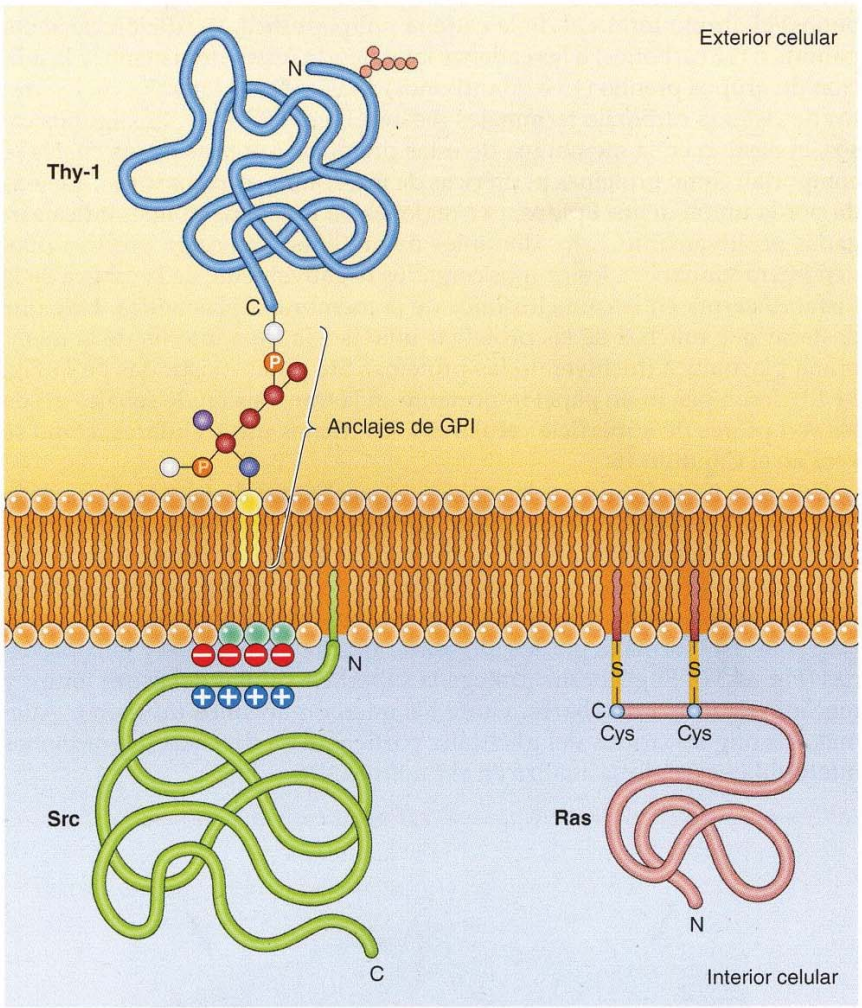


FIGURA 14.10 Ejemplos de proteínas unidas a la membrana plasmática mediante lípidos y glicolípidos. Algunas proteínas (p. ej., la proteína linfocitaria Thy-1) se unen a la capa externa de la membrana plasmática mediante anclajes de GPI que se añaden a su C-terminal en el retículo endoplásmico. Estas proteínas son glicosiladas y expuestas en la superficie celular. Otras proteínas se unen a la capa interna de la membrana plasmática tras ser traducidas por los ribosomas citosólicos libres. La proteína Src se une a través de un grupo miristoilo unido a su N-terminal. Una región cargada positivamente de Src también desempeña un papel en la asociación de membrana, tal vez por la interacción con los grupos delanteros de carga negativa de fosfatidilserina. La proteína Ras, que aquí se muestra, se une por un grupo prenilo fijado a la cadena lateral de una cisteína C-terminal y por un grupo palmitoilo unido a una cisteína localizada cinco aminoácidos más adelante. Las estructuras de estos grupos lipídicos y glicolipídicos se muestran desde las Figuras 9.34 a 9.37.

fieren al retículo endoplasmático y que se unen a la membrana por una región C-terminal transmembrana (véase Fig. 11.18). El fragmento transmembrana se escinde cuando se añade el anclaje de GPI, por lo que estas proteínas permanecen unidas a la membrana solamente por el glicolípido. Puesto que las cadenas polipeptídicas de las proteínas ancladas mediante GPI se transfieren al retículo endoplasmático, son glicosiladas y expuestas en la superficie de la célula tras ser transportadas a la membrana plasmática.

Otras proteínas se unen a la capa interna de la membrana plasmática a través de lípidos asociados por enlace covalente. Estas proteínas, en vez de ser procesadas a través de la vía secretora, se sintetizan en ribosomas citosólicos libres y son modificadas después por la adición de lípidos. Estas modificaciones incluyen la adición de ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) al amino terminal de la cadena polipeptídica, la adición de ácido palmítico (16 carbonos) a las cadenas laterales de restos de cisteína, y la adición de grupos prenilo (15 o 20 carbonos) a las cadenas laterales de los restos de cisteína carboxilo terminales (véanse Figs. 9.35-9.37). En algunos casos, el destino en la membrana de estas proteínas (muchas de las cuales se comportan como proteínas periféricas de membrana) está marcado, además de por la unión de los lípidos, por regiones de la cadena polipeptídica cargadas positivamente. Estos dominios de proteínas con carga positiva pueden interaccionar con los grupos cargados negativamente de la cabeza de la fosfatidilserina en la cara citosólica de la membrana plasmática. Hay que destacar que muchas de las proteínas unidas a la capa interna de la membrana plasmática (incluyendo las proteínas Src y Ras mostradas en la Fig. 14.10) desempeñan un papel importante en la transmisión de señales desde los receptores de superficie celulares a las dianas intracelulares, como se verá en el Capítulo 16.

Como se ha indicado ya, las partes extracelulares de las proteínas de la membrana plasmática pueden estar fuertemente glicosiladas. De forma similar, las partes de carbohidratos de los glicolípidos están expuestas a la cara externa de la membrana plasmática. Por lo tanto, la superficie de la célula está revestida por una cubierta de carbohidratos conocida como **glicocáliz**, que está formada por los oligosacáridos de glicolípidos y glicoproteínas (**Fig. 14.11**). El glicocáliz protege la superficie celular del estrés iónico y mecánico y forma una barrera ante los microorganismos invasores. Además, los oligosacáridos del glicocáliz participan en diversas interacciones intercelulares (como se analiza en el Capítulo 15).

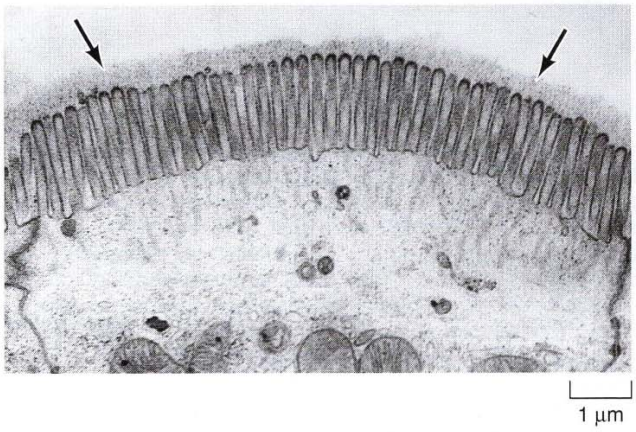


FIGURA 14.11 Glicocálix. Micrografía electrónica de epitelio intestinal, mostrándose el glicocálix *(flechas).*

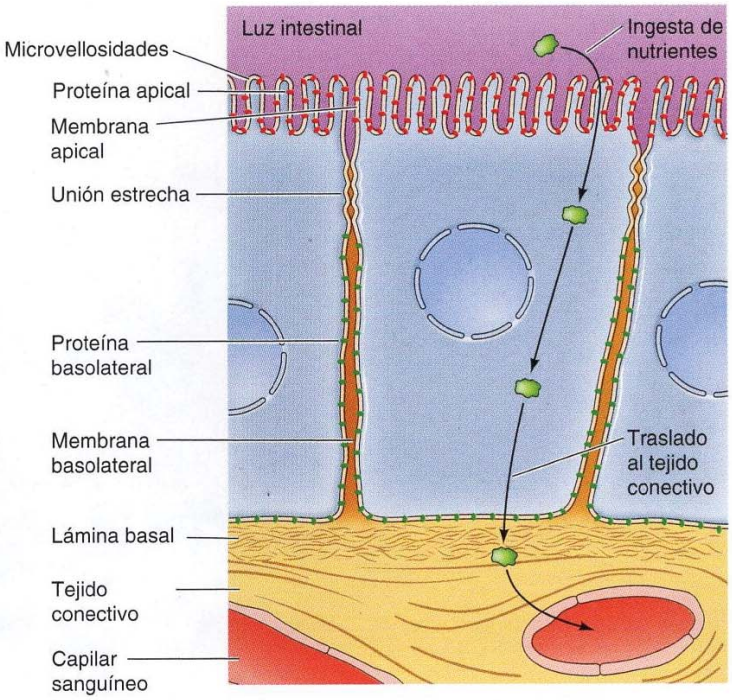


FIGURA 14.12 Célula epitelial intestinal polarizada. La superficie apical de la célula contiene microvellosidades y está especializada en la absorción de nutrientes desde la luz intestinal. La superficie basolateral está especializada en la transferencia de los nutrientes absorbidos al tejido conectivo subyacente, que contiene capilares sanguíneos. Las uniones estrechas separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática y evitan que las proteínas de membrana se difundan desde un dominio a otro.

Dominios de membrana plasmática

El modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática, propuesto en 1972, se ha mantenido como base de nuestros conocimientos de la estructura de la membrana plasmática. Sin embargo, varios avances en los últimos 40 años han modificado nuestra visión acerca de la organización de la membrana plasmática. En particular, el modelo del mosaico fluido original veía las membranas como fluidos viscosos, con proteínas con libertad para moverse a través de la bicapa lipídica. Hoy sabemos que la movilidad de muchas proteínas de membrana plasmática está limitada y que, en lugar de ser uniformes, las membranas están compuestas por distintos dominios que asumen importantes cometidos estructurales y funcionales.

Muchas células están polarizadas, con diferentes dominios de sus membranas plasmáticas responsables de realizar distintas actividades. Un ejemplo destacado es el proporcionado por las células epiteliales, que forman láminas que cubren la superficie del cuerpo y revisten los órganos internos. Los mamíferos tienen más de 100 tipos diferentes de células epiteliales, cada una de ellas especializada en una función determinada, como la protección (para la piel), la ingesta de nutrientes (células epiteliales del intestino) y la secreción (células epiteliales mamarias). Para llevar a cabo la ingesta de nutrientes y la secreción en direcciones específicas a través de la lámina epitelial, las células epiteliales se polarizan cuando están organizadas en tejidos, de tal manera que diferentes partes de la célula llevan a cabo distintas funciones. Las membranas plasmáticas de células epiteliales se dividen en los **dominios apical** y **basolateral** (**Fig. 14.12**). Por ejemplo, las células epiteliales del intestino delgado actúan absorbiendo nutrientes desde el tracto digestivo. La superficie apical de estas células, que encara la luz intestinal, está cubierta por microvellosidades, que incrementa su área de superficie y facilita la absorción de nutrientes. La superficie basolateral, que encara al tejido conectivo subyacente y al aporte sanguíneo, está especializada en la transferencia hacia la circulación de los nutrientes absorbidos. Para mantener estas funciones diferenciadas, la movilidad de las proteínas de la membrana plasmática debe estar restringida a los dominios pertinentes de la superficie celu-

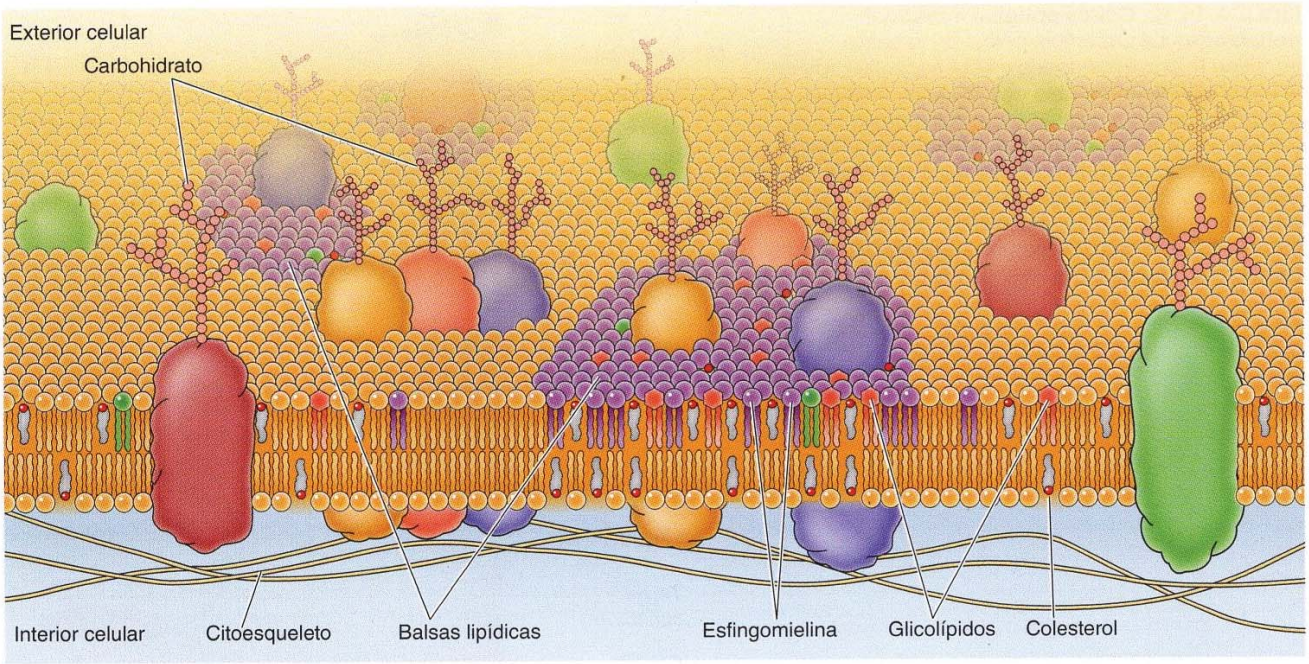


FIGURA 14.13 Modelo del mosaico fluido actualizado. Modelo actualizado de la membrana plasmática, que ilustra las balsas lipídicas y las interacciones de proteínas transmembrana con el citoesqueleto de actina subyacente. Según G. L. Nicolson, 2014. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 1451.

lar. Uno de los mecanismos por el que esto tiene lugar implica la formación de uniones estrechas (que se tratan en el Cap. 15) entre las células adyacentes del epitelio. Estas uniones no sólo sellan el espacio entre las células sino que también sirven como barreras para el movimiento de los lípidos y proteínas de membrana. Como resultado, las proteínas son capaces de difundir tanto dentro del dominio apical como del basolateral de la membrana plasmática pero no son capaces de cruzar de un dominio a otro.

La movilidad de muchas proteínas de membrana plasmática está limitada como consecuencia de la asociación con el citoesqueleto o con dominios lipídicos especializados. Estas limitaciones en la movilidad de las proteínas de membrana han llevado al desarrollo de nuevos modelos para la estructura de la membrana plasmática, en los que se incluyen las asociaciones con el citoesqueleto y los dominios de interacciones lípido-proteína especializadas (**Fig. 14.13**). Por ejemplo, las principales proteínas transmembrana de los eritrocitos (glicoforina y banda 3, véase Fig. 14.8) están asociadas con el citoesqueleto cortical de espectrina-actina que subyace a la membrana plasmática (véase Fig. 13.13). En consecuencia, no tienen libertad para moverse en la bicapa lipídica. Las proteínas transmembrana que están fijadas al citoesqueleto no sólo tienen restricciones en su movilidad: actúan también como barreras que limitan la movilidad de otras proteínas de membrana. Las interacciones con proteínas en la superficie de células adyacentes o con la matriz extracelular también restringen la movilidad de algunas proteínas transmembrana.

La difusión libre de algunas proteínas de membrana está limitada por su asociación con dominios lipídicos especializados. Como se ha indicado antes, la esfingomielina, los glicolípidos y el colesterol forman dominios agrupados conocidos como **balsas lipídicas** (véase Fig. 14.3). Las balsas lipídicas son pequeñas estructuras temporales (10–200 nm) que actúan como plataformas en las que pueden concentrarse determinadas proteínas para facilitar sus interacciones (véase Fig. 14.13). Están enriquecidas con proteínas ancladas a GPI y proteínas transmembrana que intervienen en diversas funciones, entre ellas la señalización celular, el movimiento de las células y la endocitosis. Las balsas lipídicas han sido difíciles de estudiar debido a su

VÍDEO 14.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v14.2

Recambio de la balsa lipídica. Las balsas lipídicas son extensiones pequeñas, temporales y semisólidas presentes en la membrana plasmática y compuestas por colesterol y esfingolípidos.

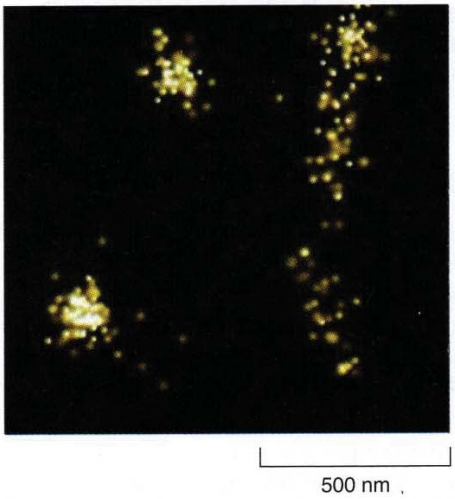


FIGURA 14.14 Microscopia de superresolución de balsas lipídicas. Balsas lipídicas visualizadas con una sonda fluorescente para colesterol. (Según H. Mizuno y cols., 2011, *Chem. Sci.* 2: 1548).

pequeño tamaño, inferior al límite de resolución de 200 nm, de la microscopia óptica convencional (abordada en el Capítulo 1). Sin embargo, los métodos de reciente desarrollo de la microscopia de superresolución, que proporcionan una resolución en el intervalo de 10-100 nm (véase Fig. 1.39), han permitido visualizar balsas lipídicas en células vivas (**Fig. 14.14**). Las balsas lipídicas interaccionan también con el citoesqueleto, que puede estabilizar las balsas y dividir aún más la membrana plasmática en dominios especializados.

Las **cavéolas** (del latín, «pequeñas cuevas») definen un subconjunto de balsas lipídicas que fueron identificadas inicialmente por microscopia electrónica como invaginaciones de 60–80 nm de la membrana plasmática (**Fig. 14.15**). Están formadas por oligómeros de la proteína de membrana llamada caveolina, que interacciona con la proteína citoplásmica cavina. La caveolina también interacciona con el colesterol, y para la formación de cavéolas se necesita un alto contenido de colesterol de membrana. El número de cavéolas en la membrana plasmática de diferentes tipos de células es muy variable: algunas células carecen de cavéolas detectables, mientras que estas balsas son abundantes en otros tipos de células, hasta representar la mitad de la membrana plasmática en las células endoteliales y los adipocitos. Se han relacionado con diversas actividades celulares, como la endocitosis, la seña-

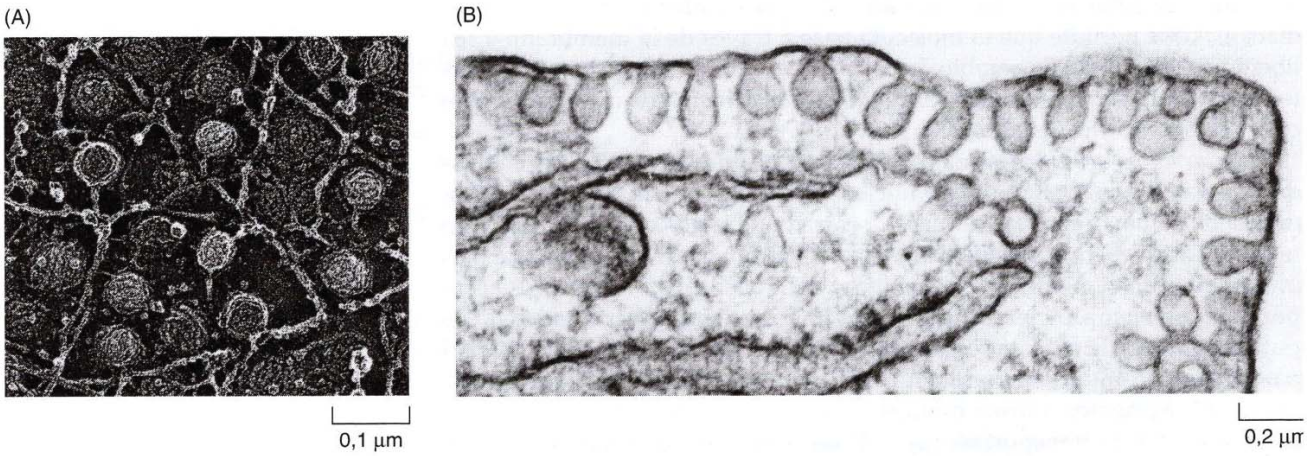


FIGURA 14.15 Cavéolas. Micrografías electrónicas de cavéolas. (A, cortesía de John E. Heuser, Washington University School of Medicine; B, cortesía de R. G. W. Anderson, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas).

lización celular, la regulación del transporte de lípidos y la protección de la membrana plasmática contra el estrés mecánico. Estos y otros posibles cometidos de las cavéolas todavía no se conocen bien y se mantienen como campos activos de investigación.

Transporte de moléculas pequeñas

La célula mantiene su composición interna debido a que la membrana plasmática es selectivamente permeable a las moléculas pequeñas. Como se vio en el Capítulo 2, únicamente los gases (como el O_2 y el CO_2), las moléculas hidrofóbicas (p. ej., hormonas esteroideas), y las moléculas pequeñas polares pero sin carga (como el H_2O y el etanol) son capaces de difundir a través de la membrana plasmática (véase Fig. 2.36). Las moléculas polares grandes no cargadas, como la glucosa, son incapaces de atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, al igual que tampoco lo pueden hacer las moléculas cargadas, independientemente del tamaño (incluyendo aminoácidos pequeños como H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^-). El transporte de estas moléculas a través de la membrana requiere la participación de proteínas de canal y transportadores específicos que de esta forma controlarán el tráfico de la mayoría de las moléculas dentro y fuera de la célula.

Difusión facilitada y proteínas transportadoras

La **difusión facilitada** implica el movimiento de las moléculas en la dirección determinada por sus concentraciones relativas dentro y fuera de la célula. No interviene ninguna fuente de energía externa, por lo que las moléculas se desplazan a través de la membrana en la dirección determinada por sus gradientes de concentración y, en el caso de las moléculas cargadas, por el potencial eléctrico a través de la membrana. Sin embargo, la difusión facilitada se diferencia de la difusión pasiva en que las moléculas transportadas no se disuelven en la bicapa fosfolipídica. En su lugar, su tránsito viene mediado por proteínas que permiten a las moléculas transportadas atravesar la membrana sin interaccionar directamente con su interior hidrofóbico. Por tanto, la difusión facilitada permite a las moléculas cargadas y a las polares, como carbohidratos, aminoácidos, nucleósidos e iones, atravesar la membrana plasmática.

Se suelen distinguir dos clases de proteínas que intervienen en la difusión facilitada: proteínas transportadoras y proteínas de canal. Las **proteínas transportadoras** se unen, en un lado de la membrana, a las moléculas específicas que han de ser transportadas. Después sufren un cambio conformacional que permite que la molécula pase a través de la membrana y sea liberada al otro lado. En cambio, las **proteínas de canal** forman poros abiertos a través de la membrana y permiten la libre difusión de cualquier molécula del tamaño y carga apropiados.

Las proteínas transportadoras son las responsables de la difusión facilitada de los azúcares, aminoácidos y nucleósidos a través de la membrana plasmática de la mayoría de las células. La entrada de la glucosa, que es la fuente principal de energía metabólica, es una de las funciones de transporte más importantes de la membrana plasmática, y el transportador de glucosa proporciona un ejemplo bien estudiado de una proteína transportadora. Los transportadores de glucosa son una familia de 14 proteínas con especificidad parcialmente compartida por la glucosa, fructosa, y moléculas relacionadas. Tienen 12 segmentos transmembrana en α-hélice —una estructura típica de muchas proteínas transportadoras—. Estas α-hélices transmembrana están compuestas, fundamentalmente, por aminoácidos hidrofóbicos pero varias también contienen restos aminoacídicos polares que se cree que forman parte del sitio de unión de la glucosa en el interior de la proteína.

Los transportadores de glucosa funcionan alternándose entre dos conformaciones (**Fig. 14.16**). En la primera conformación, el sitio de unión a la glucosa se sitúa frente al exterior de la célula. La unión de la glucosa a este sitio induce un cambio conformacional en el transportador, de tal manera que el sitio de unión de la glucosa ahora se sitúa frente al interior celular. Entonces la glucosa puede ser liberada en el citosol y el transportador recupera su conformación inicial.

La mayoría de las células, incluyendo los eritrocitos, están expuestas a concentraciones de glucosa extracelulares más altas que las existentes en el interior de la célula, por lo que la difusión facilitada da lugar a un flujo neto de la glucosa hacia el interior. Una vez que la glucosa es captada por estas células, se metaboliza rápidamente, por lo que la concentración intracelular de glucosa permanece baja y la glucosa se sigue transportando hacia el interior celular desde el fluido extracelular. Sin embargo, debido a que los cambios conformacionales en el transportador de glucosa son reversibles, la glucosa puede ser transportada en la dirección opuesta simplemente invirtiendo los pasos de la Figura 14.16. Ese flujo inverso ocurre, por ejemplo, en las células hepáticas, en donde la glucosa se sintetiza y se libera a la circulación. Algunos transportadores de glucosa están regulados por interacciones con otras

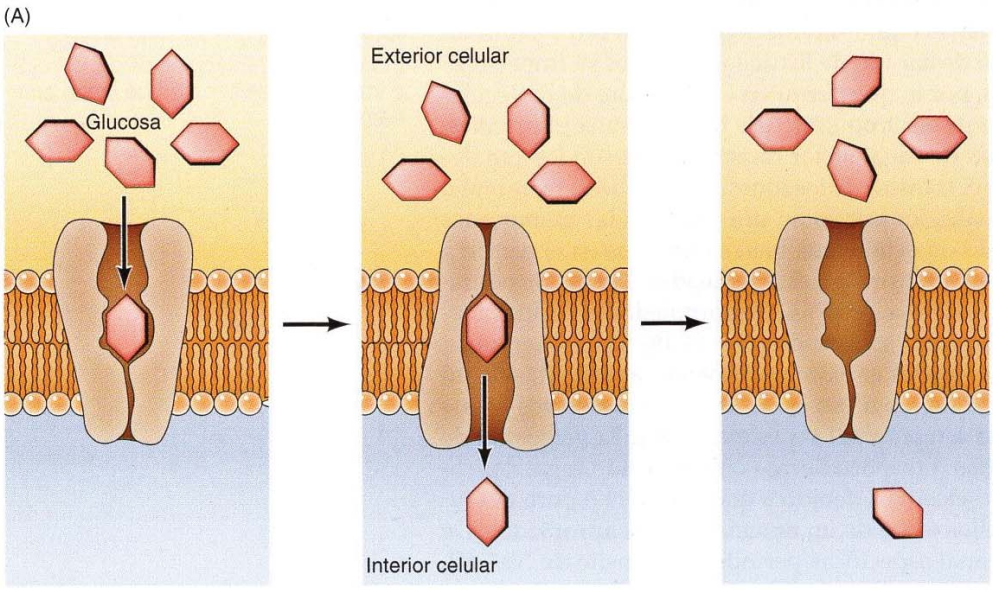


FIGURA 14.16 Difusión facilitada de la glucosa. (A) El transportador de la glucosa alterna entre dos conformaciones en donde el sitio de unión de la glucosa se encuentra alternativamente expuesto al exterior y al interior celular. En la primera conformación mostrada (imagen izquierda), la glucosa se fija al sitio expuesto al exterior de la membrana plasmática. El transportador entonces sufre un cambio conformacional, de manera que el sitio de unión de la glucosa encara al interior de la célula y la glucosa se libera al citosol (imagen central). Entonces, el transportador recupera su conformación original (imagen derecha). (B) Estructura de un transportador de glucosa con el sitio de unión a la glucosa enfrente del exterior de la célula (izquierda) y dentro de la célula (derecha). (B, según D. Deng y cols., 2015. *Nature*. doi: 10.1038/nature14655).

moléculas. Uno de estos, el GLUT4, se está estudiando intensamente porque es el transportador de glucosa implicado en el síndrome metabólico y la diabetes.

Canales iónicos

A diferencia de las proteínas transportadoras, las proteínas de canal simplemente forman poros abiertos en la membrana, permitiendo a las moléculas de pequeño tamaño y carga apropiada pasar libremente a través de la bicapa lipídica. Un grupo de proteínas de canal descritas anteriormente son las porinas, que permiten el libre tránsito de iones y moléculas polares pequeñas a través de las membranas externas de las bacterias, mitocondrias y cloroplastos (véase Cap. 12). Las proteínas de canal también permiten el paso de moléculas entre las células conectadas entre sí mediante uniones de tipo «gap», que se tratarán en el Capítulo 15. Las membranas plasmáticas de diversas células animales y vegetales diferentes también contienen proteínas de canal para el agua (**acuaporinas**), a través de las cuales las moléculas de agua pueden cruzar la membrana mucho más rápidamente de lo que pueden difundir a través de la bicapa fosfolipídica (**Fig. 14.17**). Por lo general, las acuaporinas aumentan el flujo de agua a través de las capas de células epiteliales. En las células vegetales, las acuaporinas desempeñan unos papeles destacados en el transporte ascendente de moléculas de agua en el tallo y en la regulación de la transpiración en las hojas. En las células animales, las acuaporinas mantienen el equilibrio hídrico en el cerebro y expulsan el sudor de la piel. Un rasgo destacado de las acuaporinas es su impermeabilidad a los iones cargados, por lo que permiten el paso libre de moléculas de agua sin alterar el gradiente electroquímico de la membrana plasmática.

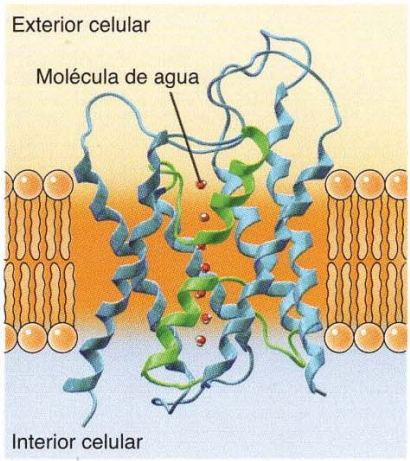


FIGURA 14.17 Estructura de una acuaporina. Las acuaporinas poseen seis α-hélices transmembrana (azul) que forman unos angostos canales acuosos que atraviesan la membrana. Dos dominios en bucle crean dos semihélices (verde) que se pliegan hacia el canal. El canal contiene un poro estrecho que permite el paso individual de moléculas de agua (rojo) e impide la traslocación de iones con carga.

Sin embargo, las proteínas de canal mejor caracterizadas son los **canales iónicos**, que intervienen en el tránsito de los iones a través de la membrana plasmática. Aunque los canales iónicos están presentes en las membranas de todas las células, han sido especialmente bien estudiados en el nervio y células musculares, donde su apertura y cierre regulados son los responsable de la transmisión de las señales eléctricas. Tres propiedades de los canales iónicos son fundamentales para su función (**Fig. 14.18**). En primer lugar, el transporte a través de los canales es extremadamente rápido. Más de un millón de iones por segundo fluyen a través de los canales abiertos —una velocidad de flujo aproximadamente mil veces mayor que la velocidad de transporte mediante proteínas transportadoras—. En segundo lugar, los canales iónicos son altamente selectivos debido a que el estrecho poro del canal restringe el paso a aquellos iones de un tamaño y carga apropiados. De esta manera, proteínas de canal específicas permiten el tránsito de Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^- a través de la membrana. En tercer lugar, la mayoría de los canales iónicos no se encuentran permanentemente abiertos. En su lugar, la apertura de los canales iónicos viene regulada por «puertas» que se abren de forma transitoria en respuesta a estímulos específicos. Algunos canales

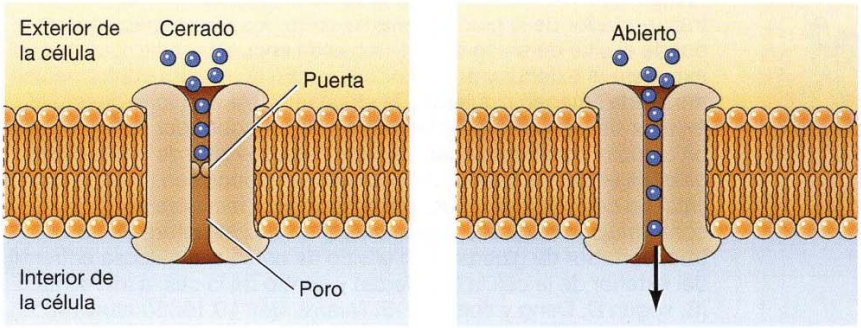


FIGURA 14.18 Modelo de un canal iónico. En la conformación cerrada, el flujo de los iones está bloqueado por una puerta. La apertura de la puerta permite a los iones fluir rápidamente a través del canal. El canal contiene un poro estrecho que restringe el tránsito a los iones del tamaño y carga apropiados.

TABLA 14.2 Concentraciones iónicas extracelulares e intracelulares

Ión	Concentración (m*M*) Intracelular	Extracelular
Axón de calamar		
K^+	400	20
Na^+	50	450
Cl^-	40–150	560
Ca^{2+}	0,0001	10
Célula de mamífero		
K^+	140	5
Na^+	5–15	145
Cl^-	4	110
Ca^{2+}	0,0001	2,5–5

(denominados **canales regulados por ligando**) se abren en respuesta a la unión de neurotransmisores u otras moléculas señal; otros (denominados **canales regulados por voltaje**) se abren en respuesta a variaciones en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática.

El papel fundamental que desempeñan los canales iónicos en la transmisión de los impulsos eléctricos fue elucidado a través de una serie de atractivos experimentos publicados por Alan Hodgkin y Andrew Huxley en 1952. Estos investigadores emplearon como modelo las células nerviosas gigantes del calamar. Los axones de estas neuronas gigantes tienen un diámetro de aproximadamente 1 mm, lo que hace posible la inserción de electrodos y la medida de la variación en el potencial de membrana que tiene lugar durante la transmisión de los impulsos nerviosos. Mediante este abordaje, Hodgkin y Huxley demostraron que los cambios en el potencial de membrana se debían a la apertura y cierre regulados de los canales de Na^+ y K^+ en la membrana plasmática.

El flujo de los iones a través de los canales de membrana depende de que se forme un gradiente iónico a través de la membrana plasmática. Todas las células, incluyendo las células nerviosas y las musculares, tienen bombas iónicas (que se describirán en la siguiente sección) que utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para realizar un transporte activo de iones a través de la membrana plasmática. El resultado es que la composición iónica del citoplasma es sensiblemente diferente a la del fluido extracelular (**Tabla 14.2**). Por ejemplo, el Na^+ es bombeado activamente fuera de las células, mientras que el K^+ es bombeado hacia dentro. Debido a esto, en el axón de calamar la concentración de Na^+ es casi 10 veces más alta en el fluido extracelular que dentro de la célula, mientras que la concentración de K^+ es aproximadamente 20 veces mayor en el citosol que en el medio circundante.

Debido a que los iones están cargados eléctricamente, su transporte supone que se establezca un gradiente eléctrico a través de la membrana. En el axón en reposo del calamar hay un potencial eléctrico de aproximadamente 60 mV a través de la membrana plasmática, siendo el interior de la célula negativo con respecto al exterior celular (**Fig. 14.19**). Este potencial eléctrico

◆ El axón gigante de calamar es aproximadamente 100 veces mayor en su diámetro que los axones típicos de mamíferos. Su gran diámetro permite la transducción de impulsos nerviosos a gran velocidad, lo que es vital para la rápida respuesta de huida de los calamares en presencia de depredadores.

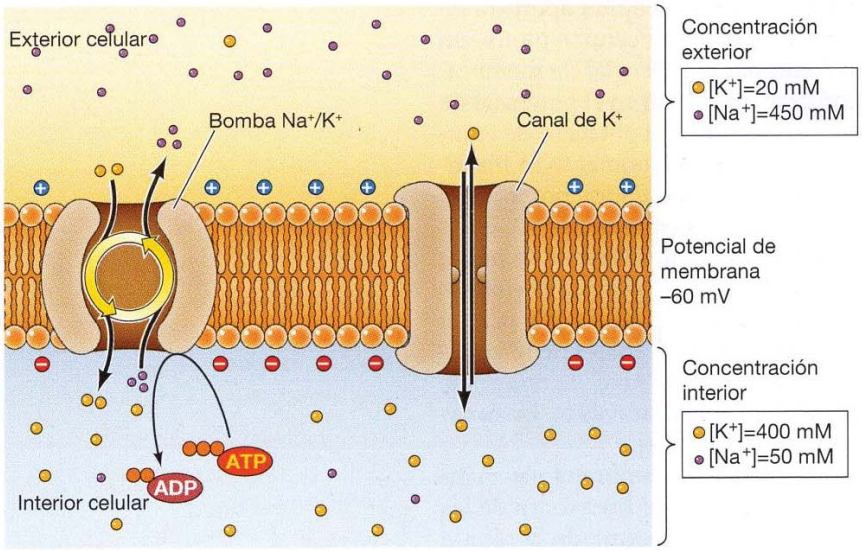


FIGURA 14.19 Gradientes iónicos y potencial de membrana en reposo del axón de calamar gigante. Solamente se representan las concentraciones de Na^+ y K^+ debido a que éstos son los iones que actúan en la transmisión del impulso nervioso. El Na^+ es bombeado fuera de la célula, mientras que el K^+ es bombeado hacia el interior, por lo que la concentración de Na^+ es superior en el exterior que en el interior del axón, y la concentración de K^+ es mayor dentro que fuera. La membrana en reposo es más permeable al K^+ que al Na^+ u otros iones porque contiene canales de K^+ abiertos. El flujo de K^+ a través de estos canales supone una mayor aportación al potencial de membrana en reposo de –60 mV, que estará próximo al potencial de equilibrio del K^+.

se debe a las bombas iónicas y al flujo de los iones a través de los canales que estén abiertos en la membrana plasmática de la célula en reposo. La membrana plasmática de los axones en reposo de calamar contiene canales de K^+ abiertos, por lo que es más permeable al K^+ que al Na^+ o a otros iones. Como consecuencia, el flujo de K^+ supone la principal aportación al potencial de membrana en reposo.

Como se describió en el Capítulo 12, el flujo de los iones a través de la membrana está dirigido tanto por el componente de la concentración como por el componente del voltaje de un gradiente electroquímico. Por ejemplo, la concentración 20 veces superior de K^+ en el interior del axón de calamar medio extracelular dirige el flujo de K^+ hacia el exterior celular. Sin embargo, debido a que el K^+ se encuentra cargado positivamente, este flujo de K^+ desde la célula genera un potencial eléctrico a través de la membrana encontrándose el interior de la célula cargado negativamente. Este potencial de membrana se opone al flujo continuo de K^+ hacia el exterior de la célula, por lo que el sistema alcanza el estado de equilibrio en el que el potencial de membrana contrarresta al gradiente de concentración del K^+.

Cuantitativamente, la relación entre la concentración iónica y el potencial de membrana viene dada por la **ecuación de Nernst**:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

donde V es el potencial de equilibrio en voltios, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, z es la carga del ión, F es la constante de Faraday, y C_o y C_i son las concentraciones del ión en el exterior y en el interior celular, respectivamente. Existe un potencial de equilibrio para cada ión por separado, y el potencial de membrana viene determinado por el flujo de todos los iones que atraviesan la membrana plasmática. Sin embargo, debido a que los axones de calamar en reposo son más permeables al K^+ que al Na^+ o que a otros iones (incluyendo Cl^-), el potencial en reposo de membrana (–60 mV) se encuentra próximo al potencial de equilibrio determinado por las concentraciones intracelulares y extracelulares de K^+ (–75 mV).

A medida que los impulsos nerviosos (**potenciales de acción**) viajan a lo largo de los axones, la membrana se despolariza (**Fig. 14.20**). El potencial de membrana varía desde –60 mV a, aproximadamente, +30 mV en menos de un milisegundo, tras lo cual vuelve a ser negativo y retorna a su valor de reposo. Estos cambios se deben a la apertura y cierre rápido y secuencial de los canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje. Una variación pequeña del potencial de membrana (de –60 mV a –40 mV) provoca la rápida apertura de los canales de Na^+. Esto permite el flujo de Na^+ al interior celular, motivado tanto por su gradiente de concentración como por el potencial de membrana. La repentina entrada de Na^+ causa una gran alteración en el potencial de membrana, que aumenta a cerca de +30 mV, acercándose al potencial de equilibrio del Na^+ que es aproximadamente +50 mV. En ese momento se inactivan los canales de Na^+ y se abren los canales de K^+ regulados por voltaje, aumentando sensiblemente la permeabilidad de la membrana al K^+. El K^+ entonces sale rápidamente de la célula, debido tanto al potencial de membrana como al gradiente de concentración del K^+, lo que provoca que el potencial de membrana descienda rápidamente hasta valores de –75 mV (el potencial de equilibrio del K^+). Entonces se inactivan los canales de K^+ regulados por voltaje y el potencial de membrana retorna a su nivel de reposo de –60 mV, determinado por el flujo de K^+ y de otros iones a través de los canales que permanecen abiertos en las células no estimuladas.

La despolarización de las regiones adyacentes de la membrana plasmática permite a los potenciales de acción viajar a lo largo de los axones de las células nerviosas como señales eléctricas, dando como resultado la rápida

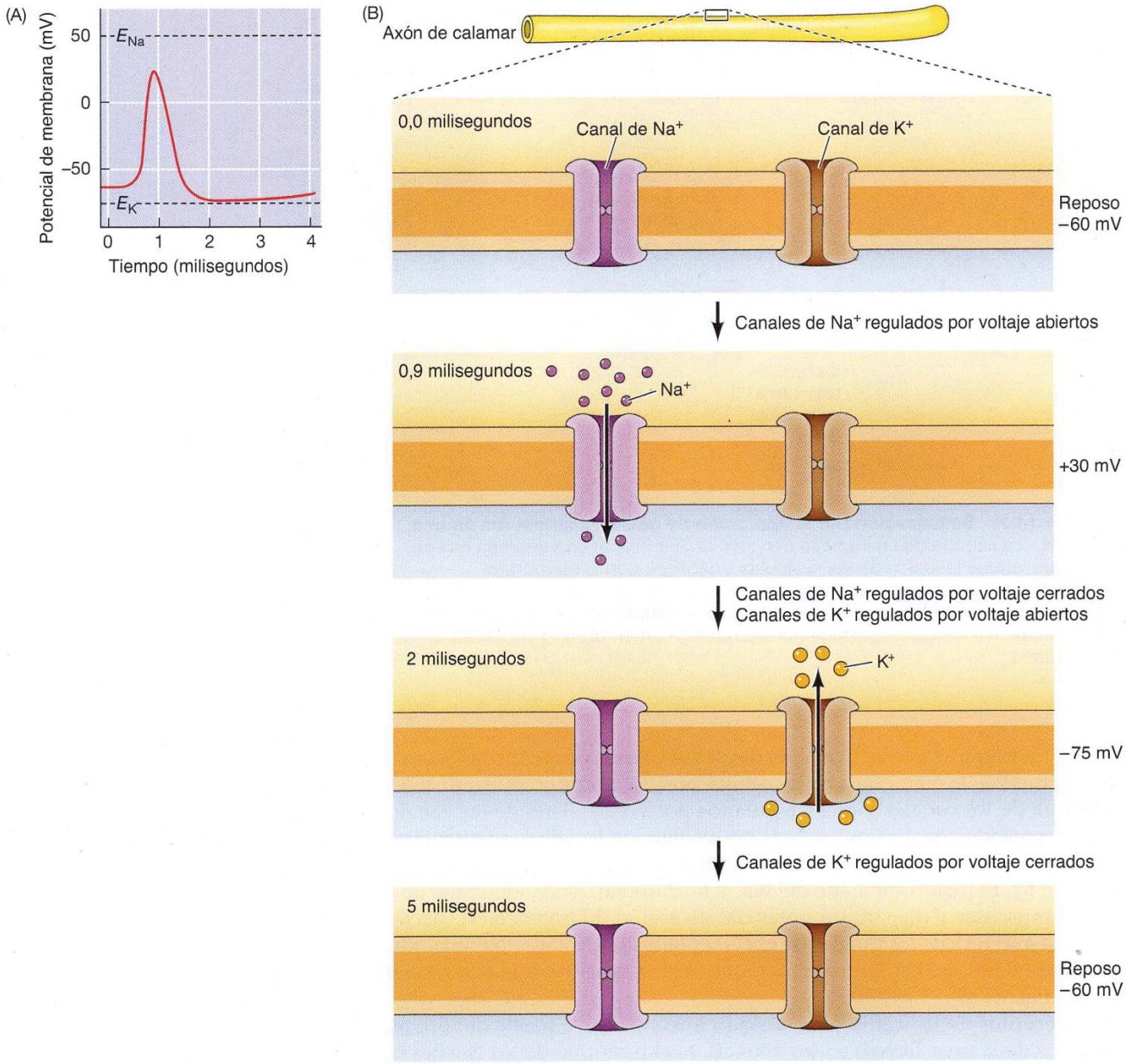
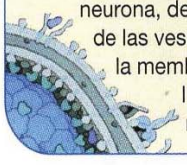


FIGURA 14.20 Potencial de membrana y canales iónicos durante un potencial de acción. (A) Variación del potencial de membrana en un punto del axón gigante de calamar después de un estímulo. E_{Na} y E_K son los potenciales de equilibrio para el Na^+ y el K^+, respectivamente. (B) Primero, el potencial de membrana aumenta a medida que se abren los canales de Na^+ regulados por voltaje. Después, el potencial de membrana cae por debajo de su valor de reposo a medida que los canales de Na^+ se inactivan y los canales de K^+ regulados por voltaje se abren. Entonces los canales de K^+ regulados por voltaje se inactivan, y el potencial de membrana retorna a su valor de reposo.

ANIMACIÓN 14.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a14.1



Una sinapsis química. La llegada de un impulso nervioso al final de una neurona, desencadena la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, liberando así los neurotransmisores.

transmisión de los impulsos nerviosos a través de largas distancias. Por ejemplo, los axones de las motoneuronas humanas pueden medir más de un metro de longitud. La llegada de los potenciales de acción a los terminales de la mayoría de las neuronas señala la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina, que portan las señales entre las células en la sinapsis (**Fig. 14.21**).

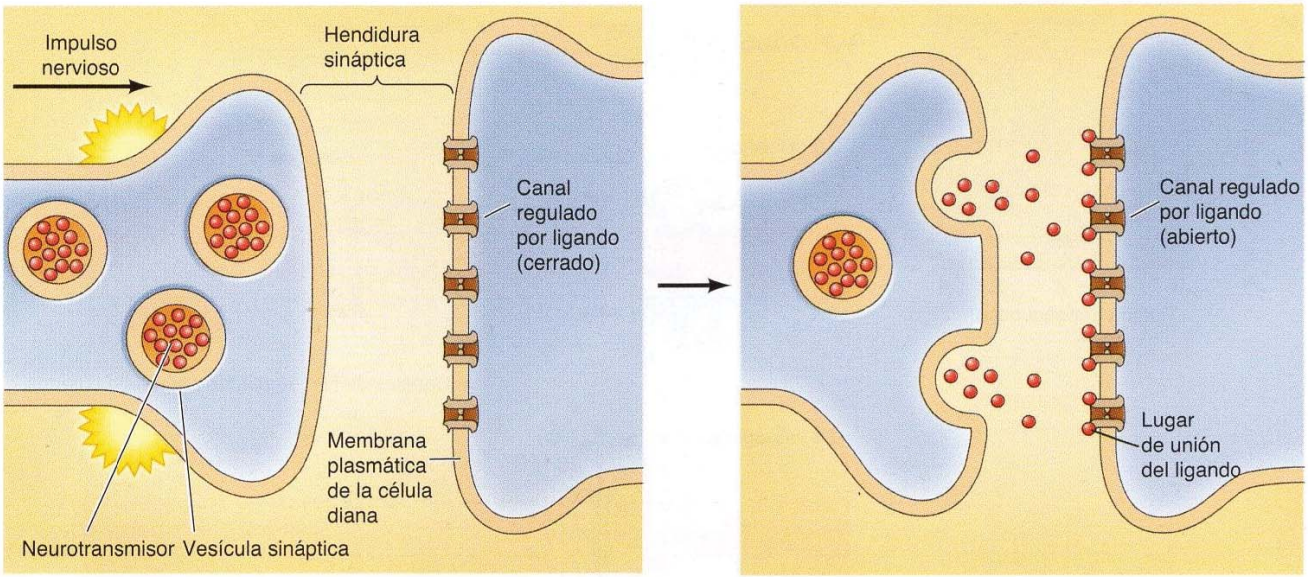


FIGURA 14.21 Señalización por la liberación de neurotransmisores en una sinapsis. La llegada de un impulso nervioso al terminal de una neurona es una señal que induce la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, lo que da lugar a la liberación del neurotransmisor desde la célula presináptica a la hendidura sináptica. El neurotransmisor se une a los receptores y abre los canales iónicos regulados por ligando en la membrana plasmática de la célula diana.

◆ Los receptores de ácido nicotínico se denominan así porque responden a la nicotina. La nicotina se une al receptor y mantiene al canal en su conformación abierta. Las moléculas que bloquean la actividad de los receptores de nicotina acetilcolina son potentes neurotoxinas; éstas incluyen varias toxinas del veneno de serpientes y el curare.

Los neurotransmisores liberados desde las células presinápticas se unen a receptores en la membrana de las células postsinápticas, donde inducen la apertura de los canales iónicos regulados por voltaje. Uno de los canales mejor conocidos es el receptor de la acetilcolina de las células musculares. La unión de la acetilcolina abre un canal que es permeable tanto al Na^+ como al K^+. El flujo combinado del Na^+ y K^+ despolariza la membrana de la célula muscular y dispara un potencial de acción. El potencial de acción causa la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, lo que produce un aumento del Ca^{2+} intracelular, que será la señal para la contracción (véase Fig. 13.28).

El receptor de la acetilcolina, aislado inicialmente a partir del órgano eléctrico de la raya *Torpedo* en los años 70, es el prototipo de los canales regulados por ligando. Todos los receptores nicotínicos de acetilcolina se componen de cinco subunidades que se disponen en la membrana a modo de un cilindro (**Fig. 14.22**). Se cree que en su estado cerrado, el poro del canal se encuentra bloqueado por las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos. La unión de la acetilcolina induce un cambio conformacional en el receptor de forma que estas cadenas laterales hidrofóbicas dejan de estar en el canal, abriendo un poro que permite el paso de los iones con carga po-

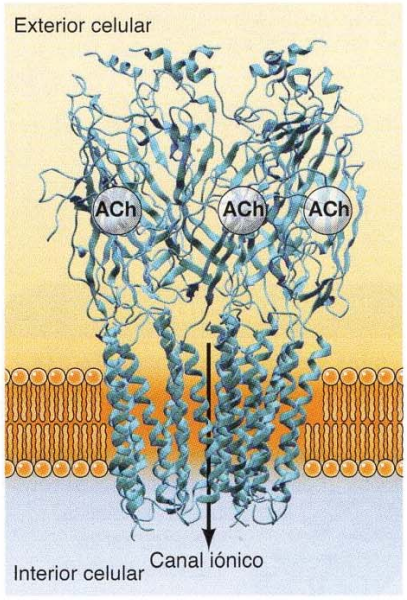


FIGURA 14.22 Modelo del receptor nicotínico de acetilcolina. En las células de mamífero, el receptor se compone de cinco subunidades (cada una de ellas dotada de cuatro dominios transmembrana) que se disponen alrededor de un poro central. En la figura se representan tres de estas subunidades. La unión de la acetilcolina a sitios de la porción extracelular del receptor induce un cambio alostérico que provoca la apertura de la puerta del canal iónico. (Adaptado de J. P. Changeaux y A. Taly, 2008. *Trends. Mol. Med.* 14: 93.)

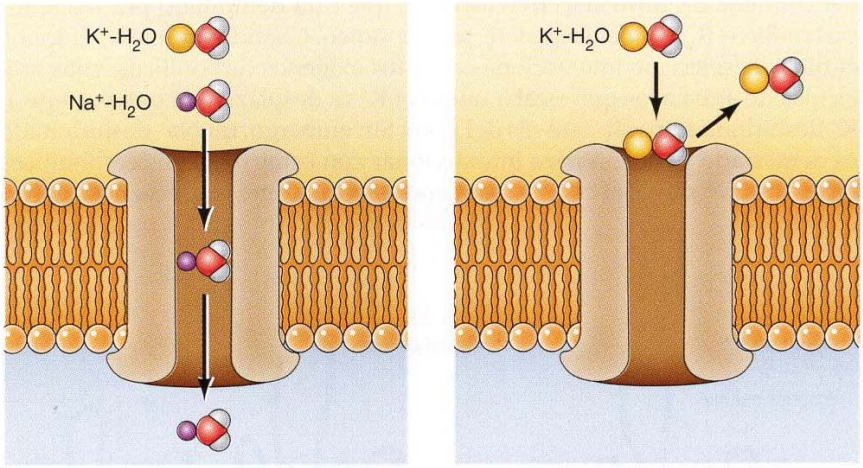


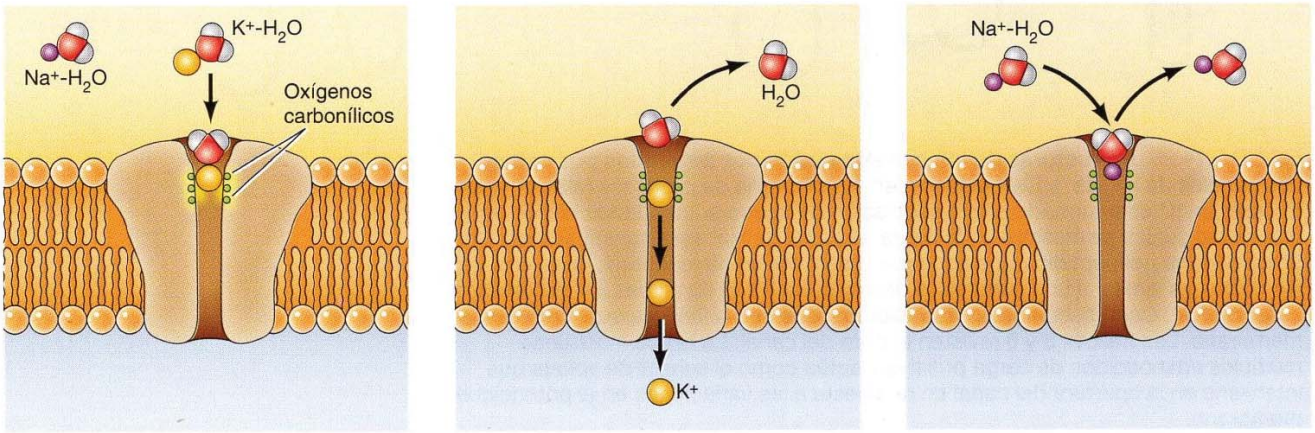
FIGURA 14.23 Selectividad iónica de los canales de Na^+. Un poro estrecho permite el paso del Na^+ unido a una única molécula de agua, pero impide el paso del K^+ o de iones mayores.

sitiva, incluyendo Na^+ y K^+. Sin embargo, el canal permanece impermeable a los iones con carga negativa, como el Cl^-, debido a que está recubierto por aminoácidos cargados negativamente.

Los canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje presentan un mayor grado de selectividad iónica. Los canales de Na^+ son más de 10 veces más permeables al Na^+ que al K^+, mientras que los canales de K^+ son más de mil veces más permeables al K^+ que al Na^+. La selectividad del canal de Na^+ se puede explicar, al menos en parte, mediante la presencia de un poro estrecho que actúa como un filtro de tamaño. El radio iónico del Na^+ (0,95 Å) es más pequeño que el del K^+ (1,33 Å), y se cree que el poro del canal de Na^+ es lo suficientemente estrecho como para impedir el paso del K^+ o de iones más grandes (**Fig. 14.23**).

Los canales de K^+ también tienen poros estrechos, que impiden el paso de los iones mayores. Sin embargo, ya que el Na^+ tiene un radio iónico más pequeño, esto no explica la permeabilidad selectiva de estos canales hacia el K^+. La selectividad del canal de K^+ se basa en un mecanismo diferente, que fue elucidado al determinarse la estructura tridimensional de un canal de K^+ por cristalografía de rayos X en 1998 (**Fig. 14.24**). El poro del ca-

FIGURA 14.24 Selectividad de los canales de K^+. El canal de K^+ contiene un filtro selectivo estrecho, delimitado por átomos de oxígeno carbonílico (C=O). El poro es lo suficientemente ancho como para permitir el paso de K^+ deshidratado, del cual han sido desplazadas todas las moléculas de agua asociadas debido a las interacciones entre el K^+ y estos átomos de oxígeno carbonílico. El Na^+ es demasiado pequeño para interaccionar con los grupos cetónicos del filtro selectivo, por lo que permanece unido al agua en un complejo que es demasiado grande para pasar a través del poro del canal.



nal contiene un filtro selectivo estrecho que está delimitado por oxígenos carbonílicos (C=O) del esqueleto polipeptídico. Cuando un ion K^+ entra en el filtro de selección interacciona con estos oxígenos carbonílicos, y las moléculas de agua a las que estaba unido el K^+ se desplazan, lo que permite al K^+ deshidratado pasar a través del poro. Sin embargo, un Na^+ deshidratado es demasiado pequeño para interaccionar con estos oxígenos carbonílicos en el filtro selectivo, el cual se mantiene abierto. Como consecuencia, el Na^+

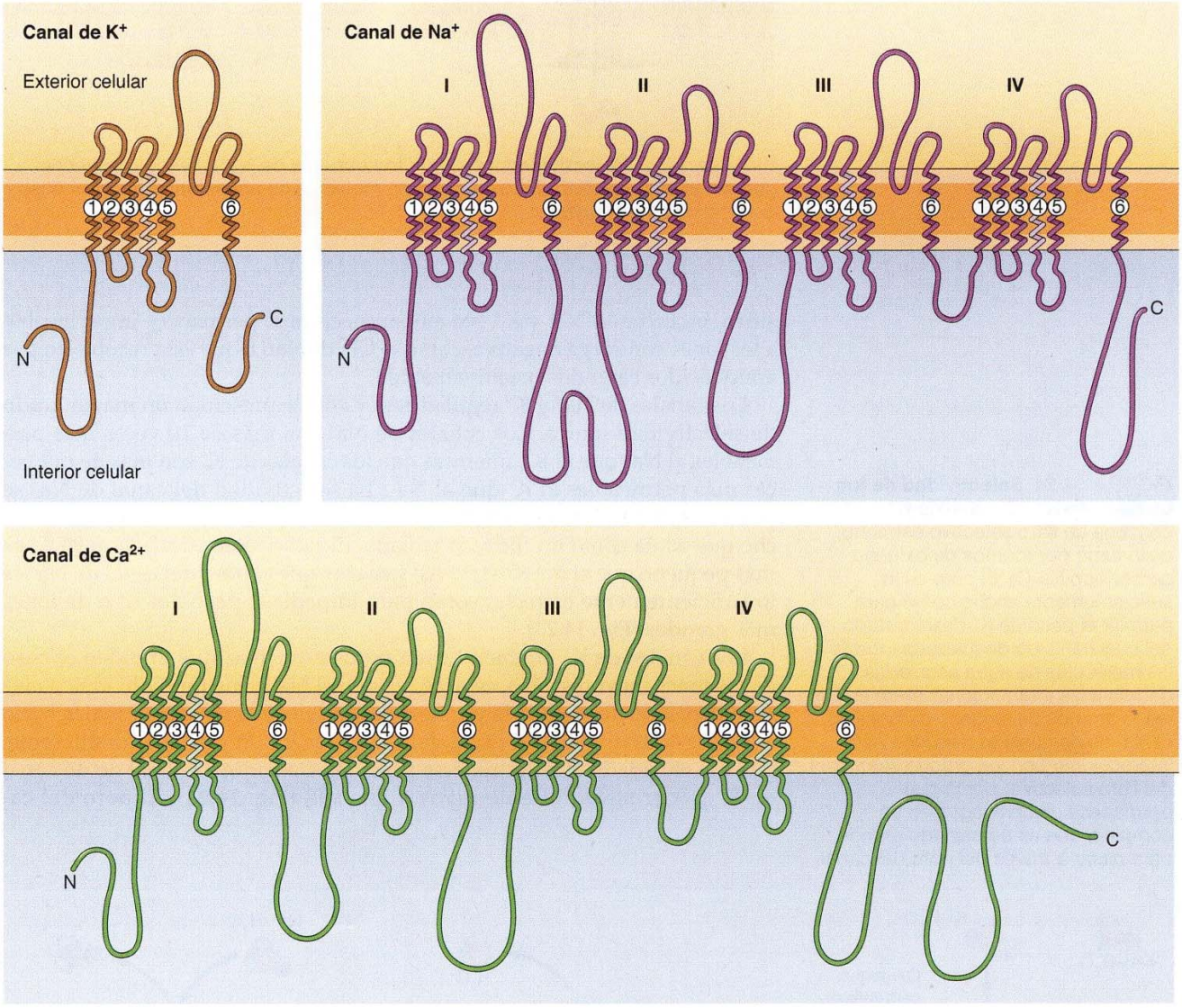


FIGURA 14.25 Estructuras de los canales catiónicos regulados por voltaje. Los canales de K^+, Na^+ y Ca^{2+} pertenecen a una familia de proteínas relacionadas. El canal de K^+ está formado por la asociación de cuatro subunidades idénticas, una de las cuales se muestra en la figura. El canal de Na^+ está constituido por una única cadena polipeptídica que contiene cuatro dominios repetidos, cada uno de los cuales es similar a una subunidad del canal de K^+. El canal de Ca^{2+} es similar al canal de Na^+. Cada subunidad o dominio contiene seis α-hélices que atraviesan la membrana. Las hélices 5 y 6 revisten el poro del canal. La hélice 4 contiene múltiples aminoácidos de carga positiva y actúa como el sensor de voltaje que interviene en la apertura del canal en respuesta a las variaciones en el potencial de membrana.

permanece unido a las moléculas de agua en un complejo hidratado que es demasiado grande para pasar a través del canal.

Los canales de K^+, Na^+ y Ca^{2+} regulados por voltaje pertenecen todos a una gran familia de proteínas relacionadas (**Fig. 14.25**). Por ejemplo, la secuencia genómica de *C. elegans* ha revelado cerca de 200 genes que codifican canales iónicos, que presumiblemente desempeñan diversos papeles en la señalización celular. Los canales de K^+ están constituidos por cuatro subunidades idénticas, y seis de ellas conteniendo varias α-hélices transmembrana. Los canales de Na^+ y Ca^{2+} están constituidos por una única cadena polipeptídica, pero cada polipéptido contiene cuatro dominios repetidos que corresponden a las cuatro subunidades del canal de K^+. El módulo básico consiste en un dominio de poro iónico entre las hélices 5 y 6, y un módulo sensor del voltaje en las hélices 1-4. La hélice 4 contiene múltiples aminoácidos de carga positiva y se cree que se mueve en respuesta a los cambios del potencial de membrana, abriendo el poro iónico.

Una amplia variedad de canales iónicos (incluyendo los canales de Ca^{2+} y Cl^-) responden a diferentes neurotransmisores, o se abren y cierran con una cinética diferente tras la despolarización de la membrana. Las acciones concertadas de todos estos canales son las responsables de la complejidad de la señalización en el sistema nervioso. Más aún, tal y como se describe en el Capítulo 16, el papel de los canales iónicos no se limita a las células eléctricamente excitables del nervio y del músculo; también desempeñan un papel crítico en la señalización en otros tipos de células. Por tanto, la apertura y el cierre regulados de los canales iónicos proporciona a las células un mecanismo sensible y versátil para responder a diversos estímulos ambientales.

ANIMACIÓN 14.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a14.2

Bomba de Na^+-K^+. Los gradientes de iones sodio y potasio a través de la membrana plasmática se mantienen por la acción de la bomba Na^+-K^+ que hidroliza el ATP para mantener el transporte de estos iones en contra de sus gradientes electroquímicos.

Transporte activo dirigido por la hidrólisis de ATP

El flujo neto de las moléculas por difusión facilitada, tanto a través de proteínas transportadoras como de proteínas de canal, siempre es energéticamente favorable en la dirección que determine el gradiente electroquímico a través de la membrana. Sin embargo, en muchos casos, la célula debe transportar moléculas en contra de su gradiente de concentración. En el **transporte activo**, se utiliza la energía proporcionada por otra reacción acoplada (como la hidrólisis de ATP) para dirigir el transporte de las moléculas en la dirección energéticamente desfavorable.

Las **bombas iónicas**, que son las responsables de mantener el gradiente iónico a través de la membrana plasmática, son un buen ejemplo de transporte activo dirigido directamente por la hidrólisis de ATP. Como ya se mencionó anteriormente (véase Tabla 14.2), la concentración de Na^+ es aproximadamente diez veces superior fuera que dentro de las células, mientras que la concentración de K^+ es mayor dentro que fuera. Estos gradientes iónicos se mantienen por la **bomba de Na^+-K^+** (también llamada la **ATPasa Na^+-K^+**) (**Fig. 14.26**), que utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar Na^+ y K^+ contra sus gradientes electroquímicos. Este proceso es el resultado de una serie de cambios conformacionales de la bomba, dirigidos por el ATP (**Fig. 14.27**). En primer lugar, los iones Na^+ se

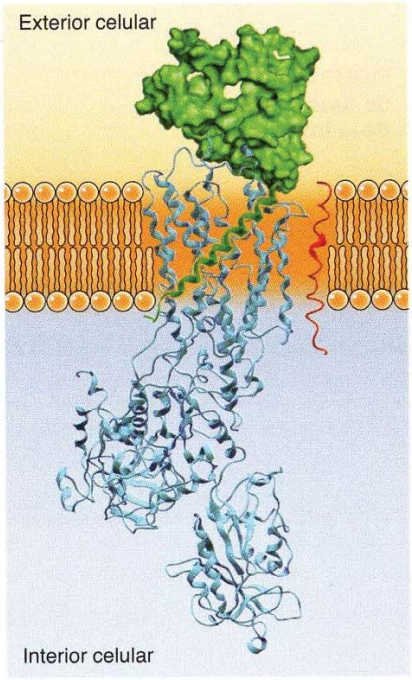


FIGURA 14.26 Estructura de la bomba de Na^+-K^+. La bomba de Na^+-K^+ es un heterodímero que consta de 10 subunidades α con dominio transmembrana (azul) y una subunidad β con un dominio transmembrana y un dominio extracelular amorfo (verde). La subunidad γ asociada (rojo) regula la actividad de la bomba de forma específica en cada tejido. (Adaptado de J. P. Morth y cols., 2007. *Nature* 450: 1043.)

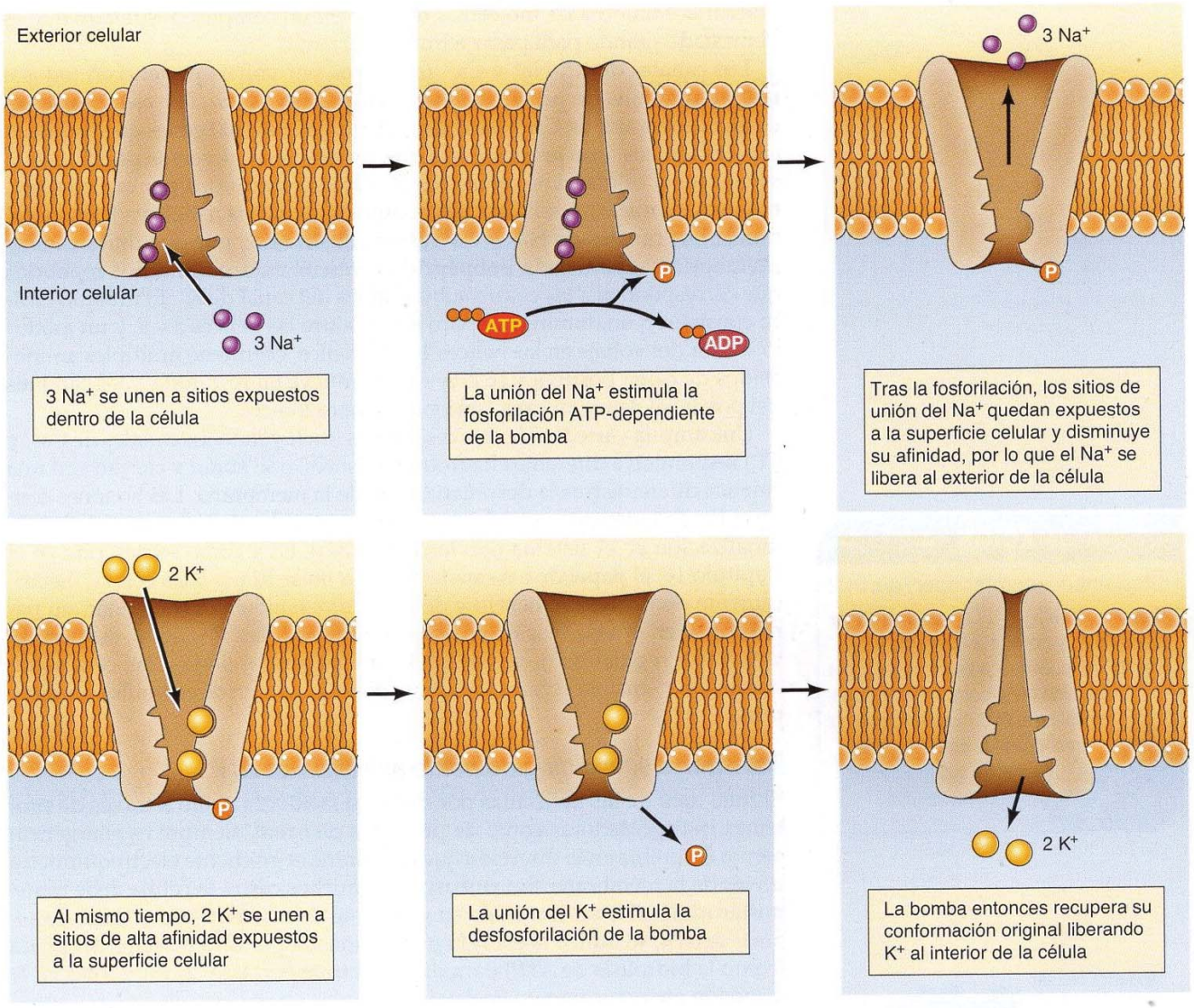


FIGURA 14.27 Modelo de funcionamiento de la bomba Na^+-K^+.

unen a sitios de alta afinidad dentro de la célula. Esta unión estimula la hidrólisis de ATP y la fosforilación de la bomba, lo que induce un cambio conformacional que expone los sitios de unión de Na^+ al exterior de la célula y reduce su afinidad por el Na^+. Como consecuencia, el Na^+ fijado se libera en los fluidos extracelulares. Al mismo tiempo, los sitios de unión de K^+ de alta afinidad se exponen sobre la superficie celular. La unión de K^+ extracelular a estos sitios estimula entonces la hidrólisis del grupo fosfato unido a la bomba, lo que induce un segundo cambio conformacional, exponiendo los sitios de unión de K^+ al citosol y disminuyendo su afinidad, por lo que el K^+ es liberado al interior de la célula. La bomba tiene tres sitios de unión para el Na^+ y dos para el K^+, por lo que en cada ciclo se tansportan tres Na^+ y dos K^+ a través de la membrana plasmática a costa de una molécula de ATP.

La importancia de la bomba de Na^+-K^+ queda reflejada en el hecho de que se estima que consume casi el 25% del ATP utilizado por muchas células animales. Un papel crítico de los gradientes de Na^+ y K^+ establecidos por la bomba es la propagación de las señales eléctricas en el nervio y en el músculo. Como se describe a continuación, el gradiente de Na^+ establecido por la bomba también se emplea para dirigir el transporte activo de otras

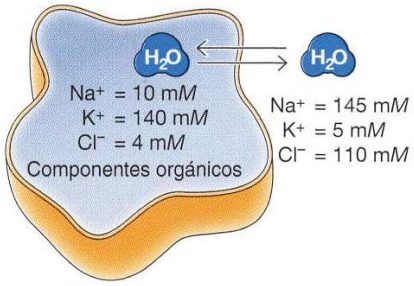


FIGURA 14.28 Gradientes iónicos a través de la membrana plasmática de una célula típica de mamífero. Las concentraciones de Na^+ y Cl^- son mayores fuera que dentro de la célula, mientras que la concentración de K^+ es mayor dentro que fuera. Las bajas concentraciones de Na^+ y Cl^- equilibran la alta concentración intracelular de los componentes orgánicos, igualando la presión osmótica y previniendo el flujo neto de agua hacia el interior.

moléculas. Otro papel importante de la bomba Na^+-K^+ en la mayoría de las células animales es mantener el equilibrio osmótico y el volumen celular. El citoplasma contiene una alta concentración de moléculas orgánicas, incluyendo macromoléculas, aminoácidos, azúcares y nucleótidos. En ausencia de algo que lo compense, esto provocaría un flujo de agua hacia el interior por ósmosis, que si no fuera controlado provocaría que la célula se hinchara y, en última instancia, explotara. La compensación requerida la proporciona el gradiente iónico establecido por la bomba de Na^+-K^+ (**Fig. 14.28**). Concretamente, la bomba establece una mayor concentración de Na^+ en el exterior que en el interior de la célula. Además, como ya se ha descrito, el flujo de K^+ a través de los canales abiertos genera un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática. Este potencial de membrana, a su vez, dirige al Cl^- fuera de la célula, por lo que la concentración de Cl^- (como la del Na^+) es casi diez veces mayor en el fluido extracelular que en el citoplasma. Estas diferencias en la concentración iónica equilibran la elevada concentración de las moléculas orgánicas dentro de las células, igualando la presión osmótica y previniendo el flujo neto de agua hacia el interior.

El transporte activo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es dirigido por una bomba de Ca^{2+} que está relacionada estructuralmente con la bomba de Na^+-K^+ (**Fig. 14.29**), y que también es impulsada por la hidrólisis de ATP. Las bombas de calcio transportan iones Ca^{2+} del citoplasma al exterior celular o a la luz del RE, por lo que las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} son extremadamente bajas: aproximadamente 0,1 mM respecto a la concentración extracelular de casi 1 mM. Esta concentración intracelular de Ca^{2+} tan baja hace que la célula sea sensible a pequeños incrementos en el nivel de Ca^{2+} intracelular. Este incremento transitorio del Ca^{2+} intracelular desempeña un papel importante en la señalización celular, como ya se mencionó al hablar de la contracción muscular (véase Fig. 13.28) y como se tratará con más detalle en el Capítulo 16.

En las membranas plasmáticas de bacterias, levaduras y células vegetales, las responsables del transporte activo de H^+ fuera de la célula son unas bombas iónicas similares. Además, el H^+ es bombeado de forma activa hacia fuera en las células que recubren el estómago, produciendo la acidez de los fluidos gástricos. Las responsables del transporte activo de H^+ al interior de los lisosomas y de los endosomas son bombas estructuralmente distintas (véase Fig. 11.39). Todavía un tercer tipo de bomba de H^+ es la ATP sintetasa de mitocondrias y cloroplastos. En este caso se puede considerar que la bomba opera en el sentido contrario, utilizando el movimiento de los iones en contra del gradiente electroquímico para dirigir la síntesis de ATP.

La mayor familia de transportadores de membrana está constituida por los **transportadores ABC**, llamados así porque se caracterizan por unos dominios de unión a ATP altamente conservados, o cajas de unión a ATP (ATP-*binding cassettes, ABC*) (**Fig. 14.30**). Se han identificado más de 100 miembros de esta familia tanto en células procarióticas como en eucarióti-

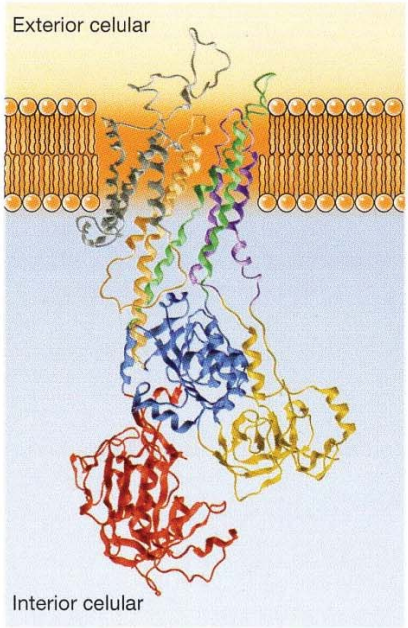


FIGURA 14.29 Estructura de la bomba de Ca^{2+}. Las subunidades citosólicas de la bomba de Ca^{2+} se representan en rojo, azul y amarillo, mientras que las subunidades transmembrana se muestran en marrón claro, verde y violeta. (Adaptado de C. Olesen y cols., 2007. *Nature* 450: 1037.)

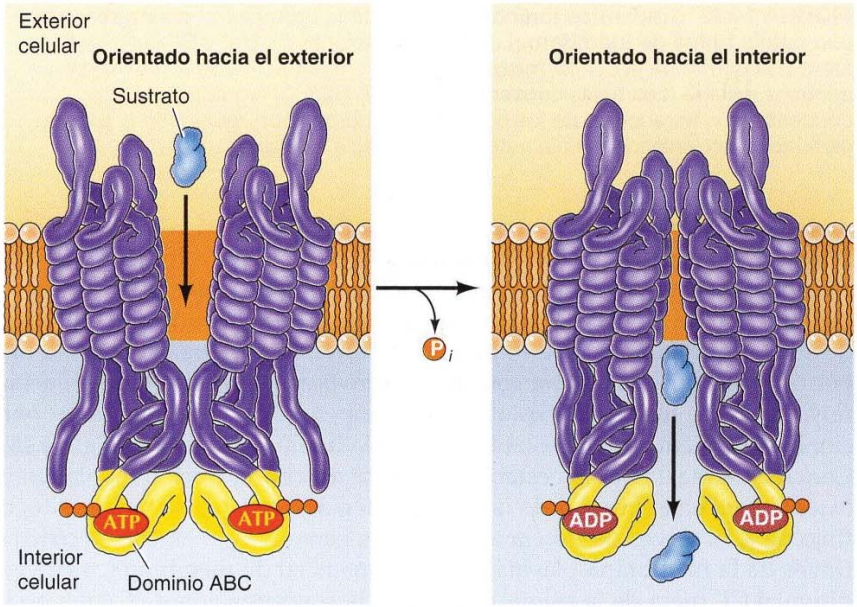
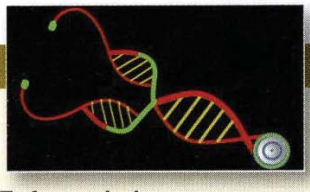


FIGURA 14.30 Modelo de transporte activo por un transportador ABC. El transportador está formado por dos dominios transmembrana (cada uno de los cuales contiene seis α-hélices extendidas a la membrana) y dos dominios de unión a ATP citosólicos (dominios ABC). El transportador ilustrado es un importador, con su sitio de unión al sustrato orientado hacia el exterior y el ATP unido al dominio ABC. La hidrólisis de ATP a ADP modifica la conformación del transportador, liberando su sustrato dentro de la célula.

cas; en *E. coli* se conocen 79 genes que codifican transportadores y en el ser humano existen al menos 48 de estos genes. Distintos miembros de la familia actúan como importadores que aportan nutrientes a las células (en los procariotas) o como exportadores que bombean las sustancias tóxicas fuera de las células (en los procariotas y eucariotas). Los transportadores ABC están compuestos por dos dominios de unión a ATP y dos dominios transmembrana. Su sitio de unión al sustrato alterna entre orientaciones hacia el exterior y hacia el interior, dependiendo de la unión a ATP y de la hidrólisis. Así, para un importador, el transportador unido a ATP está orientado hacia el exterior y se une a su sustrato fuera de la célula. La hidrólisis de ATP a ADP modifica la conformación del transportador, de manera que ahora apunta hacia el interior y libera su sustrato en el citoplasma. De este modo, el transportador utiliza la energía libre almacenada como ATP para controlar la composición interna de la célula.

En células eucariotas, el primer transportador ABC se descubrió como el producto de un gen (llamado gen de resistencia a múltiples drogas, o *mdr*) que hace resistentes a las células cancerosas a varios fármacos empleados en quimioterapia. Se han identificado dos transportadores MDR. Se expresan normalmente en varios tipos de células, donde intervienen eliminando compuestos extraños potencialmente tóxicos. Por ejemplo, la expresión de un transportador MDR en las células endoteliales de los capilares cerebrales parece que desempeña un papel importante en la protección del cerebro frente a sustancias químicas tóxicas. Desafortunadamente, se suele alcanzar con frecuencia un alto nivel de expresión de los transportadores MDR en las células cancerosas, donde reconocen a diversos fármacos y los bombean hacia el exterior de las células. Esto hace a las células cancerosas resistentes a un amplio espectro de agentes quimioterapéuticos y supone un obstáculo importante para un tratamiento eficaz del cáncer.



MEDICINA MOLECULAR

Fibrosis quística

Enfermedad

La fibrosis quística es una enfermedad genética recesiva que afecta a niños y a adultos jóvenes. Es la enfermedad hereditaria letal más común de los caucásicos, resultando afectados aproximadamente uno de cada 2.500 nacidos vivos, aunque es poco frecuente en otras razas. La disfunción característica en la fibrosis quística es la producción de un *mucus* anormalmente espeso y pegajoso por parte de varios tipos de células epiteliales, incluyendo las células que revisten los tractos respiratorio y gastrointestinal. La manifestación clínica principal es una enfermedad respiratoria debida a que las vías aéreas pulmonares se obstruyen con espesos tapones de moco, seguida del desarrollo de infecciones bacterianas recurrentes. En la mayoría de los pacientes, también afecta al páncreas debido a que los conductos pancreáticos están obstruidos por el *mucus*. Las glándulas sudoríparas también funcionan anormalmente, y la presencia de un exceso de sal en el sudor es un carácter diagnóstico de la fibrosis quística.

El tratamiento actual de la enfermedad incluye la terapia física para promover el drenaje bronquial, la administración de antibióticos y la reposición de las enzimas pancreáticas. Aunque este tratamiento ha prolongado la supervivencia de los individuos afectados hasta cerca de los 30 años de edad, la fibrosis quística es finalmente mortal, siendo la enfermedad pulmonar la responsable del 95% de la mortalidad.

Bases moleculares y celulares

La característica particular de la fibrosis quística es un transporte defectuoso de Cl^- en el epitelio afectado, incluyendo los conductos sudoríparos y las células que revisten el tracto respiratorio. En 1984 se demostró que los canales de Cl^- no funcionaban normalmente en las células epiteliales de los pacientes de fibrosis quística. La base molecular de la enfermedad se aclaró en 1989 al aislarse el gen de la fibrosis quística como un clon molecular. La secuencia del gen reveló que codificaba una proteína denominada CFTR (de **c**ystic **f**ibrosis **t**ransmembrane **c**onductance **r**egulator, regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística) que pertenecía a la familia de los transportadores ABC. Varios estudios posteriores demostraron que el CFTR actúa como un canal de Cl^- y que las mutaciones hereditarias responsables de la fibrosis quística provocan un transporte defectuoso de Cl^-. Más del 70% de éstos son una sola mutación puntual en la fenilalanina 508 que impide el plegamiento o el ensamblaje de la proteína.

Prevención y tratamiento

Como ocurre con otras enfermedades hereditarias, el aislamiento del gen de la fibrosis quística abre la posibilidad del estudio genético para identificar a los individuos portadores de alelos mutantes. En algunas poblaciones la frecuencia de portadores heterocigotos de genes mutantes es tan alta como de uno de cada 25 individuos, por lo que sería recomendable realizar un mapeo de la población total para identificar las parejas de riesgo y proporcionar un consejo genético. Además, el descubrimiento de que el CFTR actúa como un canal de Cl^- ha llevado a nuevas aproximaciones al tratamiento. Entre ellas figura la utilización de fármacos que modifican el procesamiento de las proteínas CFTR mutantes o bien estimulan la apertura de otros canales de Cl^- en el epitelio afectado.

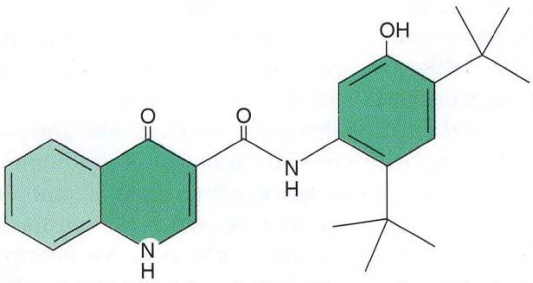
El potencial de la terapia génica se apoya en experimentos que demuestran que la introducción de un gen CFTR normal en células cultivadas de pacientes de fibrosis quística es suficiente para restaurar la función del canal de Cl^-. Estudios con animales experimentales han demostrado que los vectores virales pueden transmitir ADNc de CFTR al epitelio respiratorio, y el primer ensayo humano de terapia génica para la fibrosis quística se inició en 1993. Los ensayos hasta la fecha han demostrado que el CFTR ADNc puede transportarse y expresarse de forma segura en las células epiteliales bronquiales de los pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, la eficacia de transferencia génica ha sido demasiado baja para proporcionar cualquier beneficio clínico

En cambio, se han obtenido estimulantes avances en el desarrollo de moléculas pequeñas para el tratamiento de la fibrosis quística. El primer fármaco eficaz contra la fibrosis quística (ivacaftor) fue identificado en 2009 como resultado del cribado de moléculas pequeñas dirigidas a mutantes CFTR específicos. El ivacaftor es activo contra un CFTR mutante con ácido aspártico en lugar de la glicina en la posición 551 (la variante G551D). El CFTR G551D, responsable aproximadamente del 5% de los casos de fibrosis quística, es transportado normalmente a la membrana plasmática pero presenta deficiencias en el transporte de Cl^-. El ivacaftor incrementa el transporte de Cl^- por el mutante CFTR G551D hasta un grado en el que beneficia de manera importante a los pacientes. También es activo contra varios CFTR mutantes más, y fue aprobado para uso clínico por la FDA en 2012. Trabajos adicionales han identificado un fármaco (lumacaftor) que facilita el plegamiento del CFTR de deleción de fenilalanina 508 común. El lumacaftor recibió la aprobación de la FDA en julio de 2015 para el tratamiento de pacientes con este defecto común en CFTR.

Referencias

Armstrong, D. K., S. Cunningham, J. C. Davies and E. W. F. W. Alton. 2014. Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 99: 465–468.

Cutting, G. R. 2015. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Rev. Genet.* 16: 45–56.



Estructura del ivacaftor, el primer fármaco de moléculas pequeñas para la fibrosis quística.

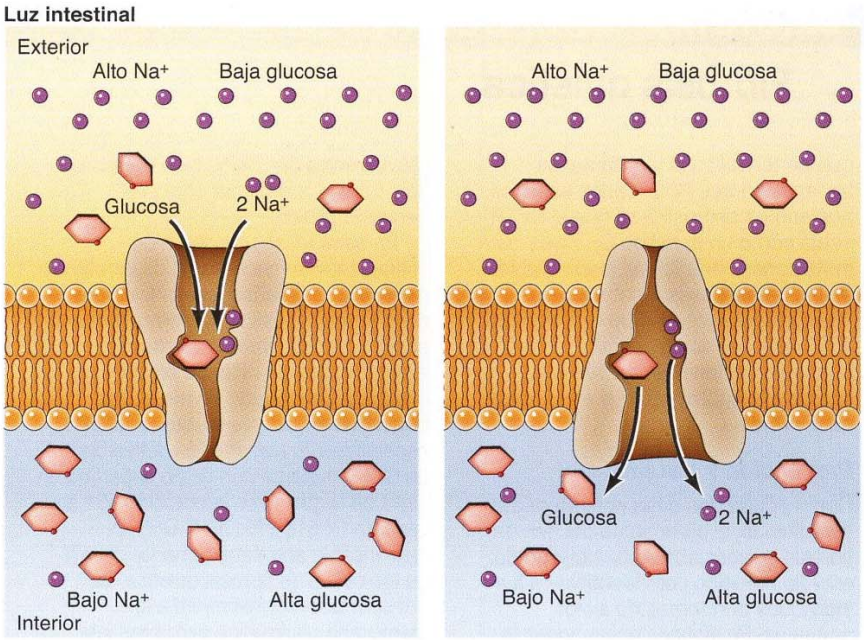


FIGURA 14.31 Transporte activo de la glucosa. El transporte activo dirigido por el gradiente de Na^+ es el responsable de la entrada de glucosa desde la luz intestinal. El transportador, de forma coordinada, une y transporta una glucosa y dos Na^+ al interior de la célula. El transporte de Na^+ en la dirección energéticamente favorable es el que dirige la entrada de la glucosa contra su gradiente de concentración.

Otro miembro importante, clínicamente hablando, de la familia de transportadores ABC es el gen responsable de la fibrosis quística. El producto de este gen (llamado regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística, o CFTR, del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), aunque es un miembro de la familia ABC, actúa como un canal de Cl^- en las células epiteliales, y la característica de esta enfermedad es un transporte defectuoso del Cl^-. El canal de Cl^- CFTR también es peculiar puesto que parece requerir tanto la hidrólisis de ATP como una fosforilación dependiente de AMPc para poder abrirse. La mayoría de los casos de fibrosis quística son el resultado de una sola mutación puntual en el CFTR que interfiere con el correcto plegado de la proteína.

Transporte activo dirigido por gradientes iónicos

Las bombas iónicas y los transportadores ABC descritos en la sección anterior utilizan la energía derivada directamente de la hidrólisis de ATP para transportar moléculas contra sus gradientes electroquímicos. Otras moléculas se transportan en contra de su gradiente de concentración empleando energía derivada no de la hidrólisis de ATP sino de acoplar el transporte de una segunda molécula en la dirección favorable energéticamente. El gradiente de Na^+ que establece la bomba de Na^+-K^+ proporciona una fuente de energía que se emplea con frecuencia para alimentar el transporte activo de azúcares, aminoácidos e iones en las células de mamíferos. Los gradientes de H^+ establecidos por las bombas de H^+ de bacterias, levaduras y células vegetales desempeñan un papel similar.

Las células epiteliales que revisten el intestino proporcionan un buen ejemplo de transporte activo dirigido por el gradiente de Na^+. Estas células emplean sistemas de transporte activo en los dominios apicales de sus membranas plasmáticas para tomar los azúcares y aminoácidos de la dieta desde la luz del intestino. La toma de glucosa, por ejemplo, se lleva a cabo por un transportador que transporta coordinadamente dos iones Na^+ y una glucosa hacia dentro de la célula (**Fig. 14.31**). El flujo de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico proporciona la energía requerida para tomar la glucosa de la

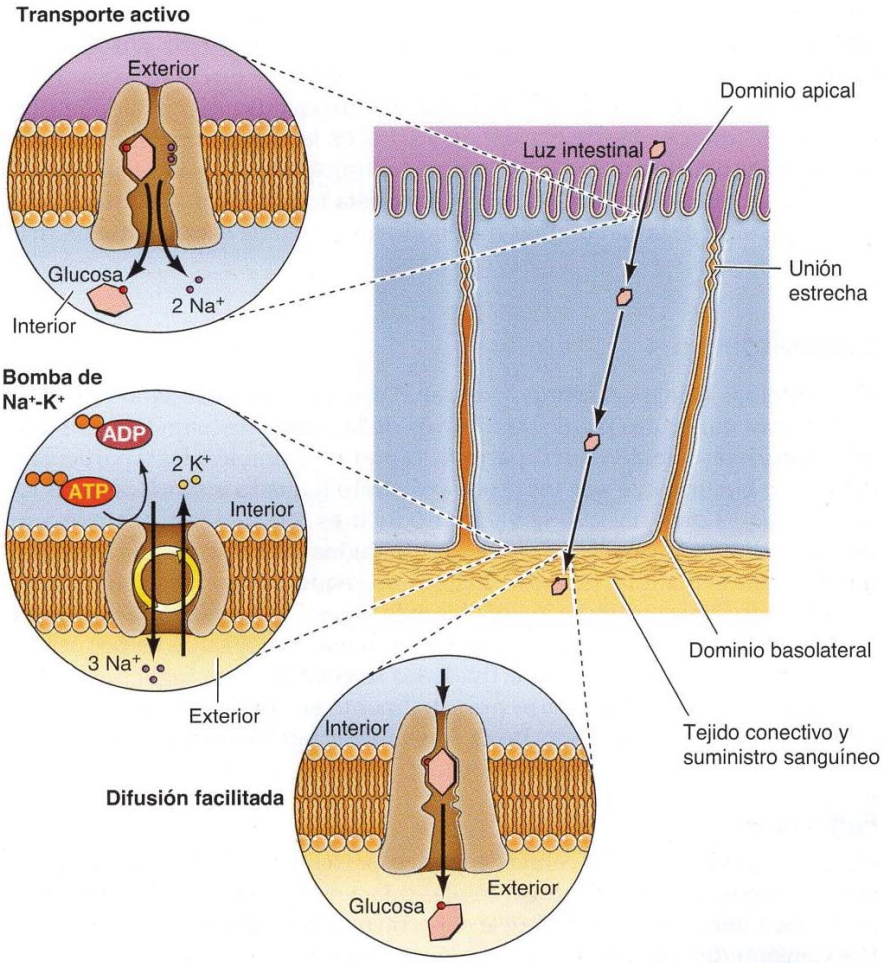


FIGURA 14.32 Transporte de glucosa por las células epiteliales intestinales. Un transportador en el dominio apical de la membrana plasmática es el responsable de la entrada activa de glucosa (por cotransporte con Na^+, como en la Fig. 14.31) desde la luz intestinal. Como resultado, la glucosa de la dieta es absorbida y concentrada dentro de las células epiteliales intestinales. La glucosa entonces se transfiere desde estas células al tejido conectivo circundante y a la corriente sanguínea a través de difusión facilitada, mediada por un transportador en el dominio basolateral de la membrana plasmática. El sistema es dirigido por la bomba de Na^+-K^+, que también se encuentra en el dominio basolateral.

dieta y acumular altas concentraciones intracelulares de glucosa. Entonces la glucosa se libera en el tejido conectivo subyacente (que contiene capilares sanguíneos) por la superficie basolateral del epitelio intestinal, a favor de su gradiente de concentración, mediante transporte por difusión facilitada (**Fig. 14.32**). De esta forma, la toma de glucosa desde la luz intestinal y su liberación a la circulación proporciona un buen ejemplo de la función polarizada de las células epiteliales, que se debe a la localización específica de los transportadores de transporte activo y de difusión facilitada en los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, respectivamente.

La entrada coordinada de glucosa y Na^+ es un ejemplo de **simporte**, el transporte de dos moléculas en la misma dirección. Por el contrario, la difusión facilitada de glucosa es un ejemplo de **uniporte**, el transporte de una única molécula. El transporte activo también puede tener lugar por **anti-**

porte, en el que dos moléculas se transportan en direcciones opuestas (**Fig. 14.33**). Por ejemplo, el Ca^{2+} se exporta desde las células no sólo por la bomba de Ca^{2+} sino también por un antiporte de Na^+-Ca^{2+} que transporta Na^+ hacia dentro de la célula y Ca^{2+} hacia fuera. Otro ejemplo viene dado por la proteína de intercambio de Na^+-H^+, que actúa en la regulación del pH intracelular. El antiportador de Na^+-H^+ acopla el transporte de Na^+ hacia dentro de la célula con la exportación de H^+, y de esta forma elimina el exceso de H^+ producido por las reacciones metabólicas y previene la acidificación del citoplasma.

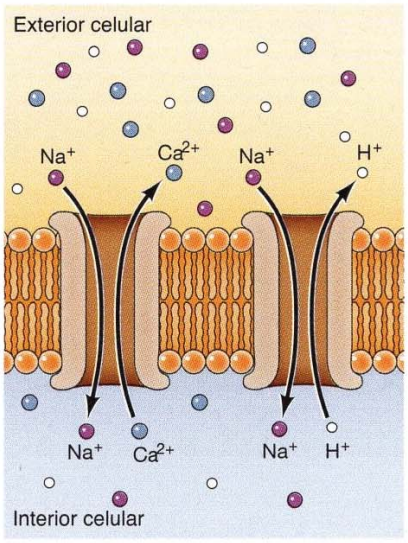


FIGURA 14.33 Ejemplos de antiporte. El Ca^{2+} y los H^+ se exportan de las células por antiportadores, que acoplan su exportación a un importe energéticamente favorable de Na^+.

Endocitosis

Las proteínas transportadoras y de canal descritas en la sección anterior transportan moléculas pequeñas a través de la bicapa fosfolipídica. Las células eucariotas también son capaces de captar macromoléculas y partículas del medio circundante por un proceso distinto llamado **endocitosis**. En la endocitosis, el material que se va a introducir es rodeado por una porción de la membrana plasmática que luego se invagina para formar una vesícula que contiene el material ingerido. El término «endocitosis» fue acuñado por Christian de Duve en 1963 e incluía tanto la ingestión de partículas grandes (como bacterias) como la entrada de fluidos o macromoléculas en pequeñas vesículas. La primera de estas actividades se conoce como **fagocitosis** (acción celular de comer) y ocurre principalmente en tipos especializados de células. Otras formas de endocitosis tienen lugar por varios mecanismos diferentes en todas las células eucariotas.

Fagocitosis

Durante la fagocitosis las células engullen partículas grandes como bacterias, desechos celulares o incluso células intactas (**Fig. 14.34**). La unión de la partícula a unos receptores sobre la superficie de la célula fagocítica dispara la extensión de seudópodos —un movimiento de la superficie celular—, como se vio en el Capítulo 13. Los seudópodos acaban rodeando a la partícula y sus membranas se funden para formar una gran vesícula intracelular (>0,5 μm de diámetro) llamada **fagosoma**. Los fagosomas entonces se fusionan con los lisosomas, dando lugar a los **fagolisosomas**, en los que el material ingerido se digiere por la acción de las hidrolasas ácidas lisosomales (véase Cap. 11).

La ingestión por fagocitosis de partículas grandes desempeña papeles distintos en los diferentes tipos de células (**Fig. 14.35**). Muchas amebas emplean la fagocitosis para capturar partículas alimenticias, como bacterias u otros protozoos. En los animales pluricelulares los papeles principales de la fagocitosis son proporcionar una defensa contra microorganismos invasores y eliminar células viejas o dañadas del cuerpo. En los mamíferos la fagocitosis de microorganismos es la función principal de tres tipos de glóbulos blancos sanguíneos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, a los que se denomina frecuentemente «fagocitos profesionales». Estas células desempeñan un papel crítico en los sistemas de defensa del organismo, eliminando los microorganismos de los tejidos infectados. Adicionalmente, los macrófagos así como otros tipos celulares, como los fibroblastos y las células

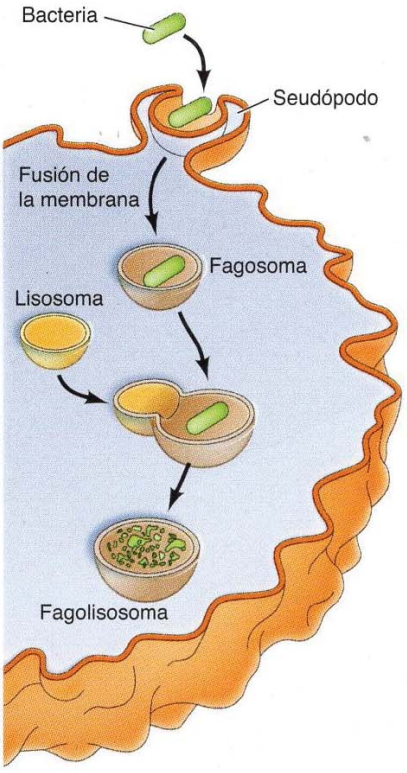


FIGURA 14.34 Fagocitosis. La unión de una bacteria a la superficie celular estimula la extensión de un seudópodo, que termina por engullir a la bacteria. La fusión de las membranas del seudópodo da como resultado la formación de una gran vesícula intracelular (un fagosoma). El fagosoma se fusiona con los lisosomas para formar un fagolisosoma, dentro del cual se digiere la bacteria ingerida.

ANIMACIÓN 14.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a14.3

Endocitosis. En la endocitosis, la membrana plasmática genera pequeñas vesículas o grandes vesículas (fagocitosis) para ingerir materias extracelulares.

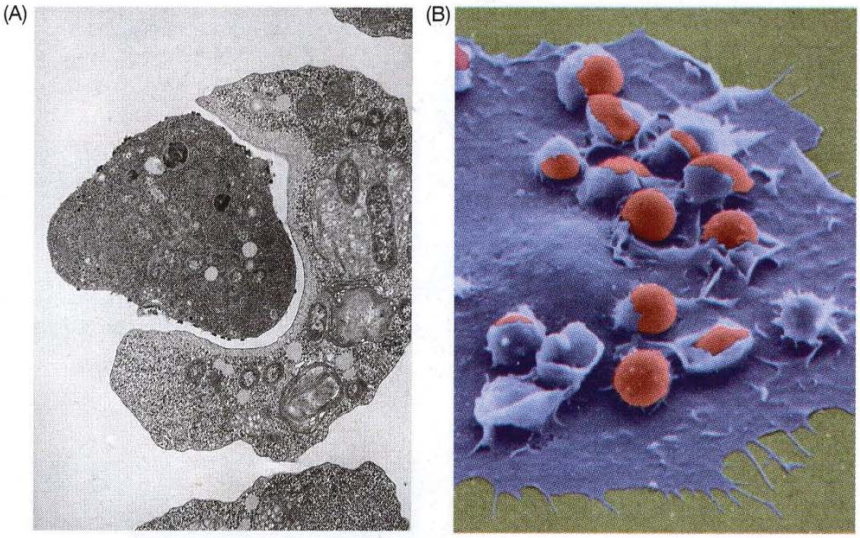


FIGURA 14.35 Ejemplos de células fagocíticas. (A) Micrografía electrónica de una ameba engullendo otro protista. (B) Micrografía electrónica de barrido de un macrófago ingiriendo glóbulos rojos. Se ha añadido color a la micrografía. (A, R. N. Band y H. S. Pankratz/Biological Photo Service; B, cortesía de Joel Swanson, Universidad de Michigan.)

epiteliales, eliminan las células envejecidas o muertas de los tejidos de todo el cuerpo, como se analiza en el Capítulo 18. Un notorio ejemplo del alcance de esta actividad viene dado por los macrófagos del bazo e hígado humanos, los cuales son responsables de la destrucción diaria de más de 10^{11} células sanguíneas avejentadas.

La **macropinocitosis** es la captación de líquidos extracelulares, en lugar de partículas, en vesículas grandes (0,2–10 µm de diámetro). Al igual que la fagocitosis, la macropinocitosis se produce por movimientos basados en actina de la membrana plasmática, que en este caso conducen a la formación de lamelipodios (proyecciones a modo de lámina de la membrana plasmática; véase Fig. 13.19). Los lamelipodios suelen retraerse en el citoplasma. Sin embargo, a veces se curvan en forma de copas abiertas de la membrana plasmática, lo cual puede seguirse de una fusión de membrana para formar una gran vesícula intracelular.

VÍDEO 14.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v14.3

Endocitosis mediada por clatrina. Primero se forma una fosa recubierta por clatrina en la superficie de la membrana, que experimenta una gemación y perfora el interior de la célula, para formar la vesícula.

Endocitosis mediada por clatrina

La mayoría de estudios de endocitosis es la **endocitosis mediada por clatrina,** que constituye un mecanismo para la captación selectiva de macromoléculas específicas. El material extracelular se introduce en vesículas de transporte, que a continuación transportan su carga a los endosomas y lisosomas. Los mecanismos de selección de la carga, formación de las vesículas, y fusión de las vesículas implicadas en la endocitosis son similares a los del transporte de vesículas en la vía secretora, detallados en el Capítulo 11. Las macromoléculas que se internarán se unen primero a receptores específicos de la superficie celular y se concentran en regiones especializadas de la membrana plasmática denominadas **invaginaciones recubiertas de clatrina** (**Fig. 14.36**). Las señales de internamiento de estos receptores se unen a las proteínas adaptadoras citosólicas, que a su vez se unen a la clatrina en la cara citosólica de la membrana, en un proceso similar a la formación de vesículas que se desprenden de la red Golgi *trans* (véase Fig. 11.36). La clatrina se ensambla en una estructura tipo cesta que distorsiona la

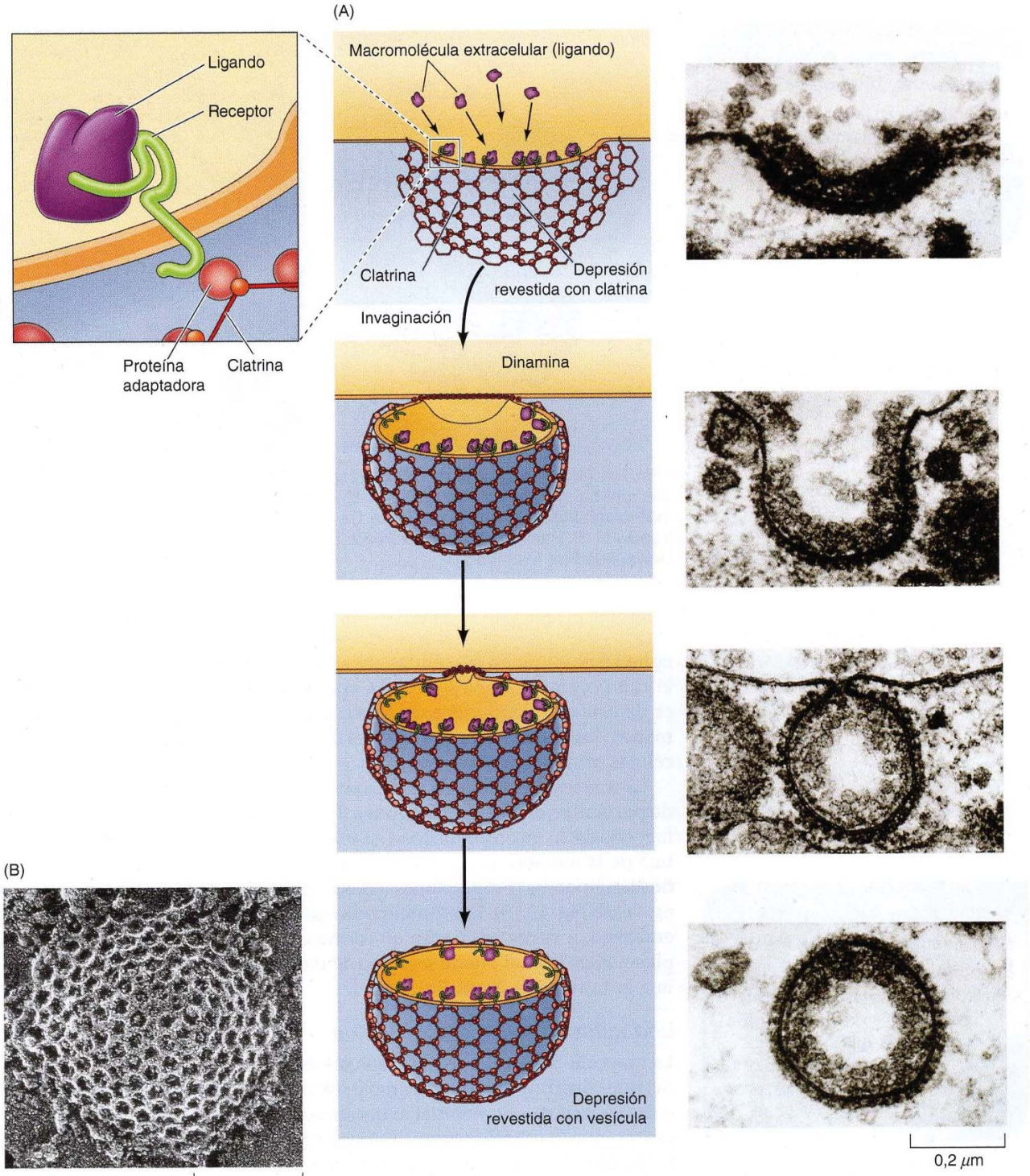


FIGURA 14.36 Formación de una vesícula revestida con clatrina. (A) Las macromoléculas extracelulares (ligandos) se unen a los receptores que se acumulan en depresiones revestidas con clatrina. Las proteínas adaptadoras se unen a la clatrina y a las señales de internamento en la cola citoplasmática de los receptores. Con la ayuda de la proteína de unión a GTP dinamina, estas depresiones se invaginan desde la membrana plasmática para formar vesículas intracelulares revestidas con clatrina. Las micrografías muestran la formación de una vesícula intracelular revestida a partir de depresiones revestidas con clatrina. (B) Micrografía de una depresión revestida con clatrina que muestra la estructura en forma de canasta de baloncesto de la red de clatrina. (A, de M.M. Perry, 1979. *J. Cell Science* 34: 266; B, cortesía de John E. Heuser, Washington University School of Medicine.)

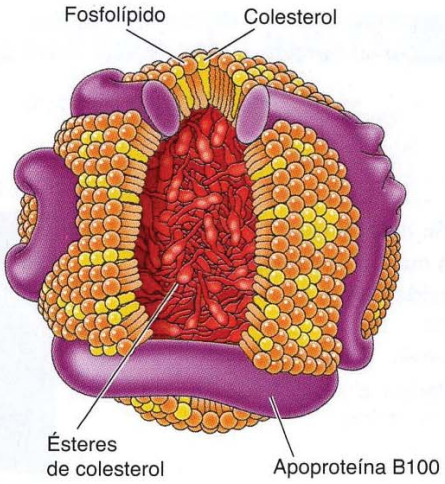
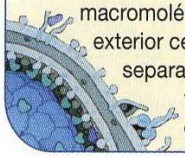


FIGURA 14.37 Estructura de una LDL. Cada partícula de LDL contiene aproximadamente 1.500 moléculas de ésteres de colesterol en un núcleo de naturaleza lipídica. El núcleo está rodeado por una cubierta que contiene 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolípido y una molécula de apoproteína B100.

ANIMACIÓN 14.4

sites.sinauer.com/cooper7e/a14.4

Invaginaciones y vesículas cubiertas de clatrina. Las moléculas de receptores de la membrana plasmática se agrupan en fosas recubiertas de clatrina; se unen a macromoléculas específicas del exterior celular y después se separan en forma de vesículas cubiertas de clatrina.



membrana, formando fosas invaginadas, que se desprenden de la membrana para dar lugar a las **vesículas recubiertas de clatrina,** en cuyo interior se encuentran los receptores y las macromoléculas a las que están unidos. La proteína **dinamina**, unida a GTP, es muy importante para la formación de vesículas. Esta proteína se dispone en anillos alrededor de los cuellos de las fosas y sufre un cambio de conformación, alimentado por la hidrólisis de GTP, que promueve la fisión de la membrana subyacente para generar vesículas recubiertas de clatrina libres en el interior de la célula. En las vesículas se incorporan también líquidos extracelulares, que experimentan gemación desde la membrana plasmática, de manera que la endocitosis mediada por clatrina produce la captación no selectiva de líquidos extracelulares y su contenido, además de la internalización de macromoléculas específicas.

La captura de colesterol por las células de mamíferos ha proporcionado un modelo clave para comprender la endocitosis mediada por clatrina a nivel molecular. El colesterol se transporta a través del torrente sanguíneo en forma de partículas lipoproteínicas, la más común de las cuales se denomina **lipoproteína de baja densidad**, o **LDL** (del inglés *low-density lipoprotein*). Cada partícula de LDL tiene un núcleo de ésteres de colesterol rodeado por una cubierta de colesterol y fosfolípidos, y una única molécula de apolipoproteína B100 (**Fig. 14.37**). Los estudios en los laboratorios de Michael Brown y Joseph Goldstein demostraron que la entrada de LDL en las células de mamíferos requiere la unión de las LDL a un receptor específico de la superficie celular que se acumula en depresiones revestidas de clatrina y que se introduce por endocitosis. El receptor posteriormente se recicla a la membrana plasmática mientras que la LDL se transporta a los lisosomas, donde se libera el colesterol para ser utilizado por la célula.

◆ El colesterol LDL se refiere como «colesterol malo» porque puede obstruir las arterias y provocar ataques cardíacos o accidentes cerebrovasculares. En cambio, el colesterol HDL se llama «colesterol bueno» porque puede eliminar el colesterol LDL de las arterias.

Los datos reveladores acerca de este proceso surgieron a partir de estudios de pacientes con una enfermedad hereditaria conocida como hipercolesterolemia familiar. Los pacientes con esta enfermedad presentan niveles muy altos de colesterol sérico y sufren ataques cardíacos prematuros. Brown y Goldstein hallaron que las células de estos pacientes eran incapaces de introducir LDL desde los fluidos extracelulares, lo que causaba que se acumulara un elevado nivel de colesterol en la circulación. Experimentos posteriores demostraron que las células de los individuos normales poseen un receptor para las LDL que se acumula en las depresiones revestidas, y que la hipercolesterolemia familiar se debe a mutaciones congénitas del receptor de LDL. Estas mutaciones son de dos tipos. Las células de la mayoría de los pacientes con hipercolesterolemia familiar sencillamente son incapaces de unir LDL, lo que demuestra que se necesita un receptor específico de la superficie

◆ Las estatinas son una clase importante de medicamentos empleados en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Ejercen su efecto mediante la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa y bloqueando la biosíntesis de colesterol.

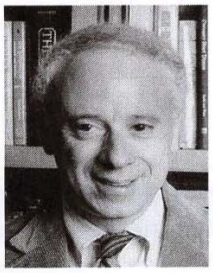
EXPERIMENTO CLAVE

Receptor de las LDL

Hipercolesterolemia familiar: unión defectuosa de lipoproteínas a fibroblastos en cultivo asociada a la regulación alterada de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa

Michael S. Brown y Joseph L. Goldstein
University of Texas Southwestern Medical School, Dallas
Proceedings of the National Academy of Science USA, 1974
Volumen 71, págs. 788-792

Michael S. Brown



Joseph L. Goldstein

Contexto

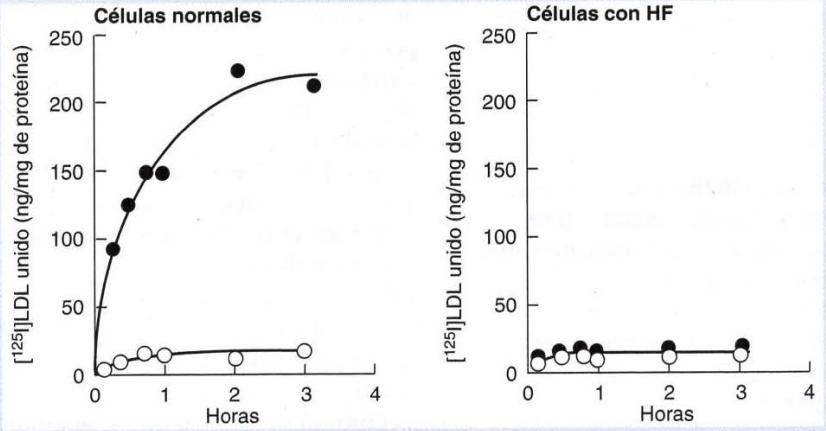
La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad genética en la que los pacientes tienen niveles muy elevados de colesterol sérico y sufren ataques de corazón prematuros. Michael Brown y Joseph Goldstein comenzaron a estudiar esta enfermedad en 1972 con la idea de que la superproducción de colesterol se debía a un defecto en los mecanismos de control que normalmente regulan la biosíntesis del colesterol. De forma consecuente con esta hipótesis, encontraron que al añadir LDL al medio de cultivo de fibroblastos normales humanos se inhibía la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), la enzima limitante en la ruta biosintética del colesterol. Por el contrario, la adición de LDL a las células de los pacientes con HF no afecta a la actividad de la HMG-CoA reductasa, lo que da como resultado la superproducción de colesterol por las células HF.

De manera quizás sorprendente, experimentos posteriores indicaron que esta anormalidad en la regulación de la HMG-CoA reductasa no se debía a una mutación en el gen de la HMG-CoA reductasa. En cambio, la regulación anormal de HMG-CoA reductasa parecía que era debida a la incapacidad de las células HF de obtener el colesterol a partir de las LDL. En 1974, Brown y Goldstein demostraron que la lesión de las células HF es un defecto en la unión de las LDL a un receptor de superficie celular. La identificación del receptor de LDL llevó a una serie de experimentos revolucionarios en los que Brown, Goldstein y sus colaboradores describieron la ruta de la endocitosis mediada por clatrina

Experimentos

En su artículo de 1974, Brown y Goldstein publicaron los resultados de experimentos en los que investigaron la unión de LDL, marcado radiactivamente, a fibroblastos tanto de individuos normales como de pacientes con HF. Se añadió una pequeña cantidad de LDL radiactiva al medio de cultivo, y se determinaba la cantidad de radiactividad unida a las células después de tiempos variables de incubación (véase figura). Cantidades crecientes de LDL radiactiva se unían a las células normales en función del tiempo de incubación. Resultaba importante el hecho de que al añadir LDL no marcado en exceso disminuía la unión de LDL radiactiva, lo que indicaba que la unión se debía a una interacción específica de las LDL con un número limitado de sitios sobre la superficie celular. La especificidad de la interacción se corroboró al observarse que cantidades en exceso de otras lipoproteínas no interferían con la unión de las LDL.

En contraste con estos resultados en los fibroblastos normales, las células de pacientes HF no unían LDL radiactiva de manera específica. Por tanto, parecía ser que los fibroblastos normales poseían un receptor específico de LDL que estaba ausente o defectuoso en las células HF. Brown y Goldstein concluyeron que el defecto observado en la unión de las LDL a las células HF «puede representar la



Transcurso de la unión de LDL radiactiva a células normales y con HF. Las células se incubaron con [^{125}I] LDL radiactiva en presencia (círculos blancos) o ausencia (círculos negros) de un exceso de LDL no marcado. Después se recogieron las células y se determinó la cantidad de LDL radiactiva fijada. Los datos se presentan como nanogramos de LDL unido por miligramo de proteína celular.

EXPERIMENTO CLAVE

alteración genética fundamental de esta enfermedad», justificando la incapacidad de la LDL de inhibir la HMG-CoA reductasa, y la superproducción resultante de colesterol. Experimentos adicionales mostraron que las LDL unidas a los fibroblastos normales están asociadas con la fracción de membrana de la célula, sugiriendo que el receptor de LDL es una proteína de superficie celular.

Impacto

Tras identificar al receptor de LDL, Brown y Goldstein demostraron que las LDL unidas a la superficie celular rápidamente se introducen y se degradan a colesterol libre en los lisosomas. En colaboración con Richard Anderson establecieron que el receptor de LDL se introduce mediante endocitosis desde depresiones revestidas. Además, sus estudios demostraron que el receptor de LDL se recicla a la membrana plasmática después de disociarse de su ligando dentro de la célula. Unos experimentos que se iniciaron con el objeto de entender la regulación de la biosíntesis del colesterol llevaron a descubrir la ruta principal por la cual las células eucariotas introducen macromoléculas específicas —un ejemplo notorio de la forma en la que la ciencia y los científicos pueden avanzar en nuevas direcciones no previstas.

celular para la entrada de LDL. Además, se identificaron algunos pacientes en cuyas células se había unido LDL pero eran incapaces de internalizarla. Los receptores de LDL de estos pacientes no se acumulaban en las depresiones revestidas, lo que proporcionaba una evidencia directa del papel central de las depresiones revestidas en la endocitosis mediada por clatrina.

Las mutaciones que impiden al receptor de LDL acumularse en las depresiones revestidas se localizan en la cola citoplasmática del receptor y pueden ser tan sutiles como un cambio de tirosina por cisteína (**Fig. 14.38**).

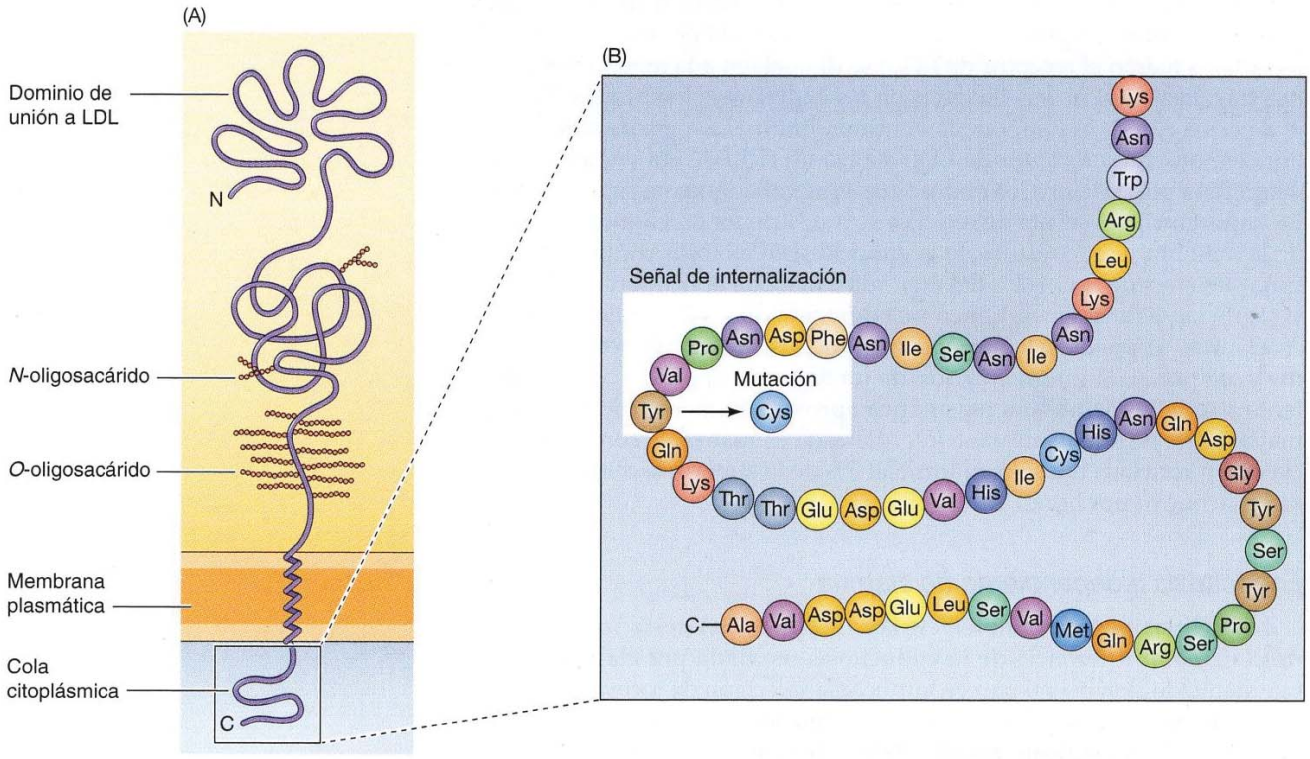


FIGURA 14.38 Receptor de LDL. (A) El receptor de LDL incluye 700 aminoácidos extracelulares, una α-hélice transmembrana de 22 aminoácidos y una cola citoplásmica de 50 aminoácidos. Los 292 aminoácidos del extremo N-terminal constituyen el dominio de unión a LDL. (B) Seis aminoácidos dentro de la cola citoplásmica definen la señal de internalización, que se reconoció por vez primera porque la mutación que determina el cambio de tirosina (Tyr) por cistina (Cys) en un caso de hipercolesterolemia familiar impide que el receptor se acumule en las depresiones revestidas.

Estudios posteriores han definido la señal de internalización del receptor de LDL como una secuencia de seis aminoácidos, incluyendo la tirosina esencial. En las colas citoplasmáticas de otros receptores captados a través de depresiones revestidas de clatrina, se encuentran señales de internalización similares, incluyendo con frecuencia restos de tirosina.

Tras su internalización, las vesículas revestidas de clatrina se despojan rápidamente de sus revestimientos y se fusionan con **endosomas** tempranos, en los que su contenido se ordena para reciclaje en la membrana plasmática o para transporte a los lisosomas (véase Fig. 11.40). Las moléculas para reciclaje (por ejemplo, receptores de la superficie celular) se hacen pasar a endosomas de reciclaje y transitan de nuevo a la membrana plasmática. En cambio, las moléculas destinadas para su degradación son transportadas a cuerpos multivesiculares y después a endosomas tardíos y lisosomas.

Una característica importante de los endosomas tempranos es que mantienen un pH interno ácido (entre 6,0 y 6,2) como resultado de la acción de una bomba de H^+ en la membrana. Este pH ácido provoca que muchos ligandos se disocien de sus receptores en el endosoma temprano. Tras este desacoplamiento, los receptores y sus ligandos pueden transportarse a destinos intracelulares diferentes. Un ejemplo clásico lo proporciona la LDL, que se disocia de su receptor en los endosomas tempranos (**Fig. 14.39**). El receptor entonces retorna a la membrana plasmática. Por otro lado, el LDL se mantiene junto a otros componentes solubles del endosoma y posteriormente es transportado a un lisosoma, donde su degradación libera al colesterol.

Reciclarse a la membrana plasmática es el destino principal de las proteínas de membrana captadas por endocitosis mediada por clatrina, y muchos receptores (como el receptor de LDL) se devuelven a la membrana plasmática tras disociarse de sus ligandos en los endosomas tempranos. El reciclaje de estos receptores supone la continua internalización de sus ligandos. Por ejemplo, cada receptor de LDL realiza un ciclo de ida y vuelta desde la membrana plasmática a los endosomas aproximadamente cada 10 minutos. La importancia de la ruta de reciclaje se muestra por la magnitud del tráfico de la membrana que resulta de la endocitosis. Las fosas recubiertas de clatrina suelen ocupar el 1-2% del área superficial de la membrana plasmática y, según las estimaciones, tienen una duración de 1 a 2 minutos. A partir de estas cifras se puede calcular que la endocitosis mediada por clatrina produce, de por sí, la internalización de un área de superficie celular equivalente a toda la membrana plasmática aproximadamente cada 2 horas. La mayor parte de esta membrana internalizada es sustituida como consecuencia de un reciclaje; tan sólo en torno al 5% de la superficie celular es sintetizada de nuevo por hora.

Endocitosis independiente de clatrina

Las células poseen también varias vías de **endocitosis independiente de clatrina**. A diferencia de la endocitosis mediada por clatrina, la independiente de clatrina no parece implicar la selección de receptores específicos de la membrana plasmática o la formación de vesículas recubiertas. Una vía de la endocitosis independiente de clatrina es la macropinocitosis, como se indicó anteriormente. La internalización de cavéolas (véase Fig. 14.15) aporta otro mecanismo de endocitosis independiente de clatrina, aunque al parecer la mayor parte de las cavéolas son dominios de membrana plasmática estables, y no están sometidas a una rápida internalización. Se han definido otras vías de endocitosis independiente de clatrina basándose en la carga transportada y en las moléculas celulares que inter-

◆ Ciertas toxinas proteicas bacterianas, como la toxina colérica, se unen a las glicoproteínas que se encuentran en las balsas lipídicas y son internalizadas por endocitosis. Una vez en el interior de vesículas endocíticas, la toxina toma el mando de la vía secretora para acceder al citoplasma, donde ejerce su efecto tóxico.

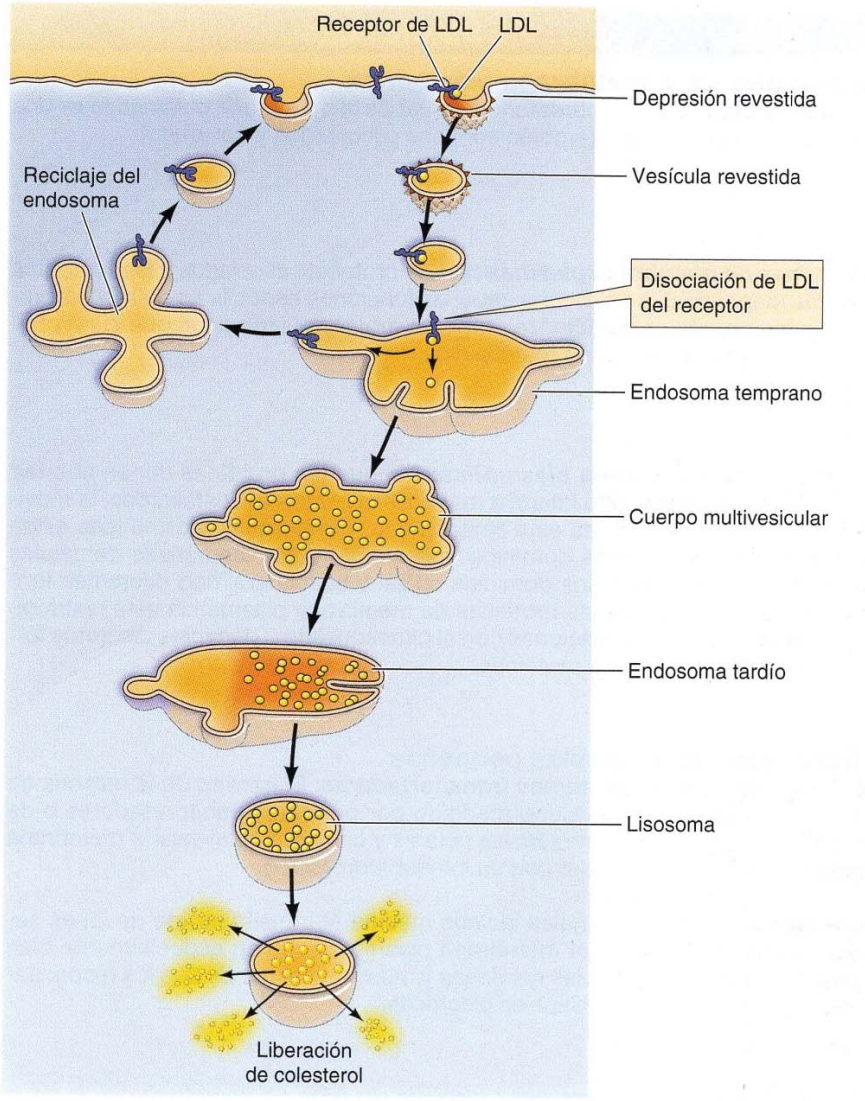


FIGURA 14.39 Clasificación en los endosomas tempranos. La LDL unida a su receptor se internaliza en vesículas revestidas de clatrina, que se desprenden de sus revestimientos y se fusionan con endosomas tempranos. Con el pH ácido de los endosomas tempranos, la LDL se disocia de su receptor, y los materiales endocitados se clasifican para su degradación en los lisosomas o su reciclaje a la membrana plasmática. El receptor es transportado a los endosomas de reciclaje y, desde aquí, a la membrana plasmática. La LDL es llevada a los endosomas tardíos y los lisosomas, donde la LDL se degrada y se libera colesterol.

vienen en la formación de vesículas. Por ejemplo, una vía de endocitosis independiente de clatrina actúa como mediadora en la captación de proteínas de membrana plasmática fijadas a GPI. La endocitosis de estas proteínas depende del colesterol de la membrana plasmática y puede estar mediada por la agrupación de tales proteínas en balsas lipídicas. Una posible función de la endocitosis independiente de clatrina es el recambio gradual de proteínas de membrana plasmática a través de la captación y degradación en lisosomas. Sin embargo, los dos mecanismos y las funciones biológicas de la endocitosis independiente de clatrina se mantienen como campos activos de investigación.

RESUMEN

Estructura de la membrana plasmática

Bicapa lipídica: La estructura fundamental de la membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica, que también contiene glicolípidos y colesterol.

PALABRAS CLAVE: **fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielina, fosfatidilinositol, glicolípidos, colesterol, balsa lipídica**

Proteínas de membrana plasmática: Las proteínas asociadas a la membrana son las responsables de llevar a cabo las funciones específicas de la membrana. La membrana se caracteriza como un mosaico fluido en el que las proteínas se insertan en la bicapa fosfolipídica.

Ver Vídeo 14.1

PALABRAS CLAVE: **modelo de mosaico fluido, proteínas periféricas de membrana, proteínas integrales de membrana, proteínas transmembrana, porinas, puente de glicosilfosfatidilinositol (GPI)**

Dominios de membrana plasmática: Aunque las proteínas tienen libertad para difundirse en sentido lateral a través de la bicapa de fosfolípidos, la movilidad de muchas proteínas está limitada y las membranas plasmáticas están compuestas por distintos dominios. Las membranas plasmáticas de células epiteliales se dividen en los dominios apical y basolateral con diferentes funciones. La movilidad de las proteínas de membrana plasmática está restringida también por sus asociaciones con el citoesqueleto y dominios discretos formados por lípidos y otras proteínas.

Ver Vídeo 14.2

PALABRAS CLAVE: **dominio apical, dominio basolateral, balsa lipídica, cavéolas**

Transporte de moléculas pequeñas

Difusión facilitada y proteínas transportadoras: El tránsito de la mayoría de las moléculas biológicas viene mediado por proteínas transportadoras o de canal que permiten a las moléculas polares y cargadas atravesar la membrana plasmática sin interaccionar con su interior hidrofóbico.

PALABRAS CLAVE: **difusión facilitada, proteína portadora, proteína de canal**

Canales iónicos: Los canales iónicos median el tránsito rápido de iones seleccionados a través de la membrana plasmática. Están especialmente bien caracterizados en las células nerviosas y musculares, donde son los responsables de la transmisión de señales eléctricas.

Ver Animación 14.1

PALABRAS CLAVE: **acuaporina, canal iónico, canal regulado por ligando, canal regulado por voltaje, ecuación de Nernst, potencial de acción**

Transporte activo dirigido por hidrólisis de ATP: La energía derivada de la hidrólisis del ATP puede dirigir el transporte de moléculas en contra de su gradiente electroquímico.

Ver Animación 14.2

PALABRAS CLAVE: **transporte activo, bomba iónica, bomba de Na^+ - K^+, ATPasa Na^+ - K^+, transportador ABC**

Transporte activo dirigido por gradientes iónicos: Los gradientes iónicos se emplean frecuentemente como una fuente de energía para conducir el transporte activo de otras moléculas.

PALABRAS CLAVE: **simporte, uniporte, antiporte**

Endocitosis

Fagocitosis: Las células ingieren partículas grandes, como bacterias y desechos celulares, por fagocitosis.

Ver Animación 14.3

PALABRAS CLAVE: **endocitosis, fagocitosis, fagosoma, fagolisosoma, macropinocitosis**

Endocitosis mediada por clatrina: La forma mejor conocida de endocitosis es la endocitosis mediada por clatrina, que proporciona un mecanismo para la entrada selectiva de macromoléculas específicas en vesículas recubiertas de clatrina.

Ver Animación 14.4 y Vídeo 14.3

PALABRAS CLAVE: **endocitosis mediada por clatrina, depresión revestida de clatrina, vesícula revestida de clatrina, dinamina, lipoproteína de baja densidad (LDL)**

Endocitosis independiente de clatrina: Las células poseen también varias vías de endocitosis que no dependen de la clatrina.

PALABRAS CLAVE: **endocitosis independiente de clatrina**

Preguntas

1. ¿Cómo se diferencian las proteínas periféricas de membrana de las proteínas integrales de membrana?
2. ¿Cómo apoyaron los experimentos de fusión celular de Frye y Edidin el modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana? ¿Qué resultados hubieran obtenido si hubiesen incubado células fusionadas a 2 °C?
3. ¿Qué son las balsas lipídicas y en qué procesos celulares están implicadas?
4. ¿Cómo contribuye la asociación con el citoesqueleto a establecer los dominios de la membrana plasmática?
5. La concentración de K^+ es casi 20 veces superior en el interior de los axones de calamar que en los fluidos extracelulares, generando un potencial de equilibrio de membrana de –75 mV. ¿Cuál sería el potencial de equilibrio de membrana esperado si la concentración de K^+ fuera solamente 10 veces mayor dentro que fuera de la célula? ¿Por qué el potencial de reposo habitual de la membrana (–60 mV) es diferente del potencial de equilibrio del K^+, de –75 mV? (Dado que: R = 1,98 × 10^{-3} kcal/mol/deg, T = 298 K, ln(x) = 2,3 $\log_{10}$(x), F = 23 kcal/V/mol)
6. El curare se une a los receptores nicotínicos de la acetilcolina y previene su apertura. ¿Cómo afectaría a la contracción muscular?
7. ¿Cómo detecta el filtro de selectividad de los canales de K^+ la diferencia entre iones K^+ y Na^+?
8. ¿Cómo puede transportarse la glucosa en contra de su gradiente de concentración sin el gasto directo de ATP en células epiteliales intestinales?
9. ¿Cómo confiere el gen *mdr* resistencia a medicamentos a las células cancerosas?
10. ¿Cómo determinaron Brown y Goldstein que el LDL se une a un número limitado de sitios de unión específicos en la superficie de células normales?
11. ¿Qué información hemos obtenido a partir de estudios sobre células de niños con hipercolesterolemia familiar sobre los mecanismos de endocitosis mediada por clatrina?
12. ¿Cómo influye en la fagocitosis un inhibidor de la polimerización de la actina? ¿Afectaría a la endocitosis mediada por clatrina?

Bibliografía

Estructura de la membrana plasmática

Cao, X., M. A. Surma and K. Simons. 2012. Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Res.* 22: 793–805. [R]

Diesenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. The structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3-Å resolution. *Nature* 318: 618–624. [P]

Engelman, D. M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438: 578–580. [R]

Hansen, C. G. and B. J. Nichols. 2010. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 20: 177–186.

Head, B. P., H. H. Patel and P. A. Insel. 2014. Interactions of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 532–545. [R]

Li, L., X. Shi, X. Guo, H. Li and C. Xu. 2014. Ionic protein-lipid interaction at the plasma membrane: what can the charge do? *Trends Biochem. Sci.* 39: 130–140. [R]

Lingwood, D. and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327: 46–50. [R]

Moraes, I., G. Evans, J. Sanchez-Weatherby, S. Newstead and P. D. S. Stewart. 2014. Membrane protein structure determination—the next generation. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 78–87. [R]

Nassoy, P. and C. Lamaze. 2012. Stressing caveolae: new role in cell mechanics. *Trends Cell Biol.* 22: 381–389. [R]

Nicolson, G. L. 2014. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta* 1838: 1451–1466. [R]

Owen, D. M., A. Magenau, D. Williamson and K. Gaus. 2012. The lipid raft hypothesis revisited - New insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *Bioessays* 34: 739–747. [R]

Parton, R. G. and M. A. del Pozo. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 98–112. [R]

Rees, D. C., H. Komiya, T. O. Yeates, J. P. Allen and G. Feher. 1989. The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 607–633. [R]

Rodriguez-Boulon, E. and I. G. Macara. 2014. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 225–242. [R]

Simons, K. and M. J. Gerl. 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 688–699. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247–296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720–731. [P]

van Meer, G., D. R. Voelker and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112–124. [R]

Transporte de moléculas pequeñas

Bell, G. I., C. F. Burant, J. Takeda and G. W. Gould. 1993. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 268: 19161–19164. [R]

Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel and P. Agre. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 425–458. [R]

Catterall, W. A. 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67: 915–928. [R]

Changeux, J.-P. and A. Taly. 2008. Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. *Trends Mol. Med.* 14: 93–102. [R]

Gadsby, D. C. 2007. Structural biology: ion pumps made crystal clear. *Nature* 450: 957–959. [R]

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500–544. [P]

MacLennan, D. H., W. J. Rice and N. M. Green. 1997. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272: 28815–28818. [R]

Maurel, C. 2007. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 581: 2227–2236. [R]

Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. Sorensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450: 1043–1049. [P]

Olesen, C., M. Picard, A. M. Winther, C. Gyrup, J. P. Morth, C. Oxvig, J. V. Moller and P. Nissen. 2007. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 450: 1036–1042. [P]

Pedersen, B. P., M. J. Buch-Pedersen, J. P. Morth, M. G. Palmgren and P. Nissen. 2007. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450: 1111–1114. [P]

Rees, D. C., E. Johnson and O. Lewinson. 2009. ABC transporters: the power to change. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 218–227. [R]

Shinoda, T., H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 A resolution *Nature* 459: 446–450. [P]

Sun, L., X. Zeng, C. Yan, X. Sun, X. Gong, Y. Rao and N. Yan. 2012. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* 490: 361–366. [P]

Thorens, B. and M. Mueckler. 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E141–E145. [R]

Toyoshima, C. and G. Inesi. 2004. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 269–292. [R]

Ward, J. M., P. Maser and J. I. Schroeder. 2009. Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Ann. Rev. Physiol.* 71: 59–82. [R]

Endocitosis

Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47. [R]

Campelo, F. and V. Malhotra. 2012. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Ann. Rev. Biochem.* 81: 407–427. [R]

Doherty, G. J. and H. T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 78: 857–902. [R]

Ferguson, S. M. and P. De Camilli. 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 75–88. [R]

Flannagan, R. S., V. Jaumouillé and S. Grinstein. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7: 61–98. [R]

Kirchhausen, T., D. Owen and S. C. Harrison. 2014. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 6:a016725. [R]

Kumari, S., M. G. Swetha and S. Mayor. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 20: 256–275. [R]

Maldonado-Báez, L., C. Williamson and J. G. Donaldson. 2013. Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Exp. Cell Res.* 319: 2759–2769. [R]

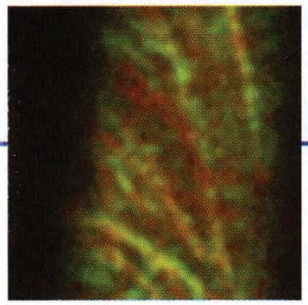
Mayor, S. and R. E. Pagano. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 603–612. [R]

McMahon, H. T. and E. Boucrot. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 125: 517–533. [R]

Schmid, S. L. and V. A. Frolov. 2011. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 79–105. [R]

Swanson, J. A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 639–649. [R]

Traub, L. M. and J. S. Bonifacino. 2013. Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5:a016790. [R]



Capítulo 15

Paredes celulares, matriz extracelular e interacciones celulares

Paredes celulares 571

Matriz extracelular e interacciones célula-matriz 577

Interacciones célula-célula 587

EXPERIMENTO CLAVE: Caracterización de la integrina 584

MEDICINA MOLECULAR: Enfermedades por las uniones de tipo *gap* 593

Aunque los límites celulares están definidos por la membrana plasmática, muchas células están rodeadas por un conjunto insoluble de macromoléculas secretadas. Las células de bacterias, hongos, algas y plantas superiores están rodeadas de paredes celulares rígidas, que son una parte integrante de la célula. A pesar de que las células animales no estén rodeadas por paredes celulares, la mayoría de las células de los tejidos animales están embebidas en una matriz extracelular que consiste en proteínas y polisacáridos secretados. La matriz extracelular no sólo proporciona soporte estructural para las células y tejidos, sino que además juega papeles importantes en la regulación del comportamiento celular. Las interacciones de las células con la matriz extracelular anclan el citoesqueleto y regulan la forma y el movimiento celular. Asimismo, las interacciones directas entre células son claves para la organización de las células en los tejidos tanto vegetales como animales, además de proporcionar canales a través de los cuales las células pueden comunicarse con sus vecinos.

Paredes celulares

Las rígidas paredes celulares que rodean a las bacterias y muchos tipos de células eucariotas (hongos, algas y plantas superiores) determinan la forma celular y previenen que las células se hinchen y estallen como resultado de la presión osmótica. A pesar de sus funciones comunes, las paredes celulares de las bacterias y eucariotas son estructuralmente muy diferentes. Las paredes celulares bacterianas consisten en polisacáridos unidos mediante enlaces cruzados con pequeños polipéptidos, que forman una coraza covalente en torno a la célula completa. Por el contrario, las paredes celulares de los eucariotas están compuestas principalmente de polisacáridos incluidos en una matriz semejante a un gel. En lugar de ser estructuras fijas, las paredes celulares vegetales pueden ser modificadas tanto durante el desarrollo de la planta como en respuesta a señales del ambiente, de modo que las paredes celulares de las plantas juegan papeles críticos en la determinación de la organización de tejidos vegetales en la estructura de la planta completa.

Paredes celulares bacterianas

Las rígidas paredes celulares bacterianas procuran protección frente a la presión osmótica y determinan las formas características de las diferentes clases de células bacterianas. Por ejemplo, algunas bacterias (como *E. coli*) tienen forma de bacilo, mientras que otras son esféricas (p. ej., *Pneumococcus* y *Staphylococcus*) o con forma de espiral (p. ej., la espiroqueta *Treponema pa-*

llidum, causante de la sífilis). Adicionalmente, la estructura de sus paredes celulares divide a las bacterias en dos amplios grupos que pueden distinguirse por un método de tinción conocida como la tinción Gram, desarrollada por Hans Christian Gram en 1884 (**Fig. 15.1**). Las bacterias gramnegativas (como *E. coli*) poseen una membrana doble en el que la membrana plasmática está rodeada por una membrana externa permeable. Estas bacterias tienen una pared celular delgada localizada entre sus membranas interna y externa. Por el contrario, las bacterias grampositivas (como el patógeno humano común *Staphylococcus aureus*) presentan solamente una única membrana plasmática, que está rodeada de una pared celular mucho más gruesa.

A pesar de estas diferencias estructurales, el principal componente de las paredes celulares tanto de las bacterias gramnegativas como grampositivas es el **peptidoglicano** (**Fig. 15.2**) que está constituido por cadenas lineales de polisacáridos, entrelazadas por péptidos cortos. Debido a su estructura entrelazada, el peptidoglicano forma una cubierta covalente fuerte alrededor de toda la célula bacteriana. Es interesante destacar que lo que les hace a las bacterias vulnerables frente a algunos antibióticos es la estructura característica de sus paredes celulares. La penicilina, por ejemplo, inhibe la enzima responsable de formar los puentes de unión cruzados entre las diferentes hebras de peptidoglicano, interfiriendo de esta manera en la síntesis de la pared celular y bloqueando el crecimiento bacteriano.

La pared celular se agrandó continuamente durante el crecimiento y la división bacterianos, de manera que el mantenimiento de la forma característica de las células bacterianas está regido por los mecanismos que controlan la síntesis de la pared celular. Es interesante observar que ésta se encuentra determinada por las proteínas citoesqueléticas bacterianas (**Fig. 15.3**). La primera proteína citoesquelética que se descubrió en las bacterias, FtsZ, es un homólogo de la tubulina de los eucariotas, que está presente en casi todas las bacterias (esféricas, en forma de bacilo y en espiral). Constituye una estructura anular en el lugar en el que se produce la división celular, dirigiendo la síntesis de la nueva pared celular que separa las células hijas recién formadas. Las bacterias en forma de bacilo, como *E. coli*, también contienen la proteína citoesquelética MreB, un homólogo de la actina, que dirige la síntesis de la pared celular durante la elongación celular. Finalmente, las bacterias de forma curva o espiral contienen proteínas relacionadas con filamentos intermedios (como la crescentina) que son responsables de la curvatura de la pared celular.

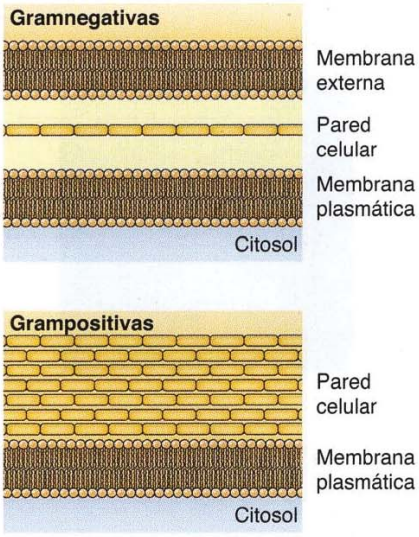


FIGURA 15.1 Paredes celulares bacterianas. La membrana plasmática de las bacterias gramnegativas está rodeada por una pared celular delgada por debajo de la membrana externa. Las bacterias grampositivas carecen de la membrana externa y tienen una pared celular gruesa.

Paredes celulares eucariotas

A diferencia de las bacterias, las paredes celulares de los eucariotas (incluyendo hongos, algas y plantas superiores) se componen principalmente de polisacáridos (**Fig. 15.4**). El polisacárido estructural fundamental de las paredes celulares de los hongos es la **quitina**, que también forma las conchas de los cangrejos y los exoesqueletos de insectos y de otros artrópodos. La quitina es un polímero lineal de residuos de *N*-acetilglucosamina. Las paredes celulares de la mayoría de las algas y de las plantas superiores se componen principalmente de **celulosa**, que es el polímero más abundante de la tierra. La celulosa es un polímero lineal de restos de glucosa que suele estar constituido por más de 10.000 monómeros de glucosa. Los restos de glucosa se unen por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$, lo que permite al polisacárido formar largas cadenas rectas. Después de su transporte a través de la membrana plasmática al espacio extracelular, las 36 cadenas polisacarídicas sencillas se asocian entre sí en paralelo para formar microfibrillas de 3 nm. Las microfibrillas de celulosa se pueden extender a lo largo de varios micrómetros.

◆ La membrana externa de las bacterias gramnegativas contiene un lipopolisacárido (LPS) conocido como endotoxina. La liberación de LPS al torrente sanguíneo desencadena fiebre, descenso de la tensión sanguínea e inflamación.

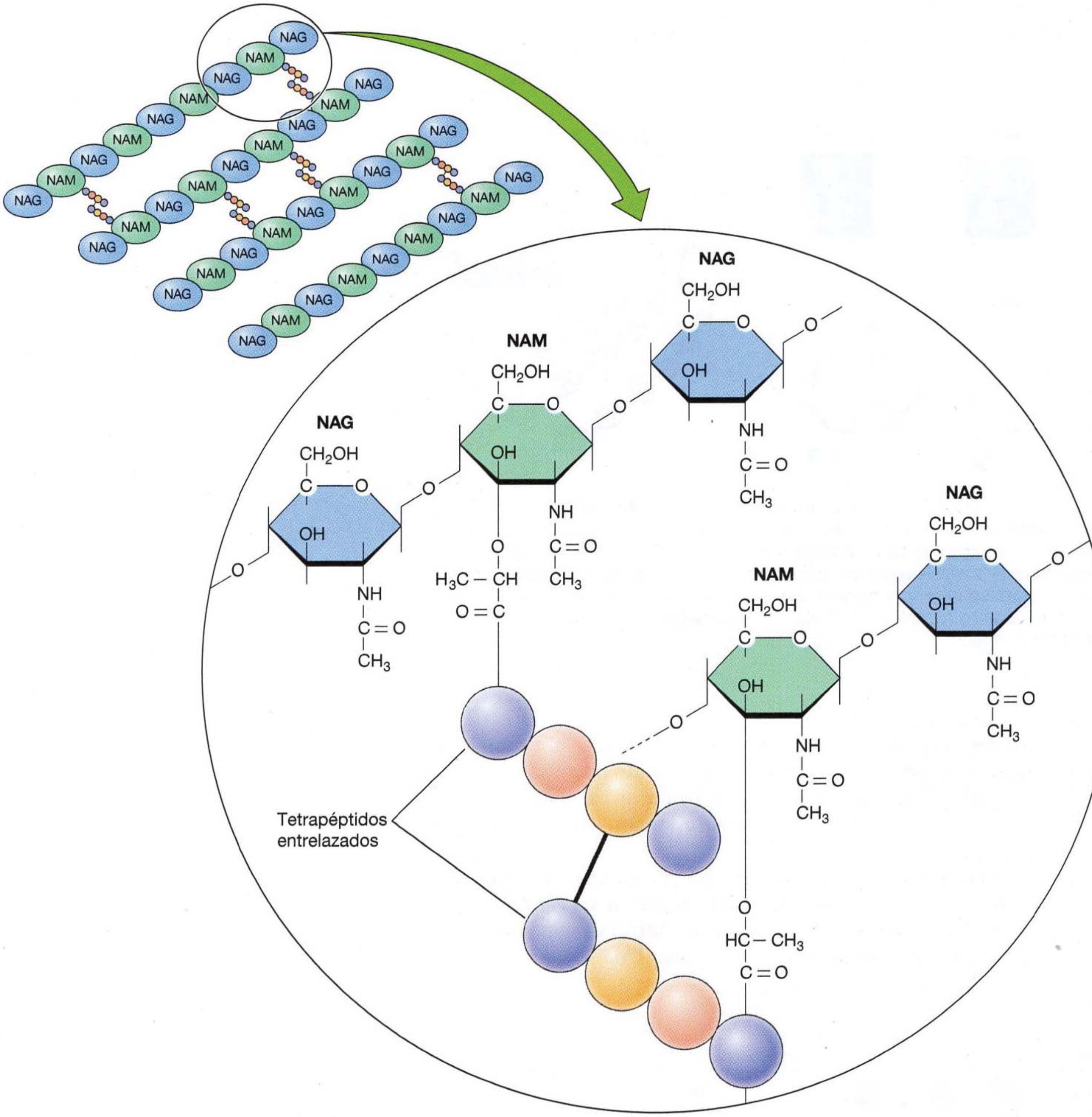


FIGURA 15.2 **Peptidoglicano de *E. coli.*** Las cadenas de polisacáridos están constituidas por restos de *N*-acetilglucosamina (NAG) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM) alternantes, unidos por enlaces glicosídicos $\beta(1 \rightarrow 4)$. Las cadenas paralelas se entrelazan por tetrapéptidos unidos a los restos de NAM. Los aminoácidos que forman los tetrapéptidos varían en las distintas especies bacterianas.

En el interior de la pared celular, las microfibrillas de celulosa están embebidas en una matriz compuesta por proteínas y otros dos tipos de polisacáridos: **hemicelulosas** y **pectinas** (**Fig. 15.5**). Las hemicelulosas son polisacáridos altamente ramificados que están unidos a las microfibrillas de celulosa por enlaces de hidrógeno (**Fig. 15.6**). Esto estabiliza las microfibrillas de celulosa para formar una fibra fuerte, responsable de la fuerza mecánica de las paredes celulares vegetales. Las microfibrillas de celulosa y hemicelulosas están inmersas en una matriz tipo gel formada por pectinas, que son polisacáridos ramificados que contienen una gran cantidad de residuos de ácido galacturónico de carga negativa. Debido a estas múltiples cargas negativas, las pectinas se unen a iones cargados positivamente (como el Ca^{2+}) y atrapan moléculas de agua para formar geles. Un ejemplo

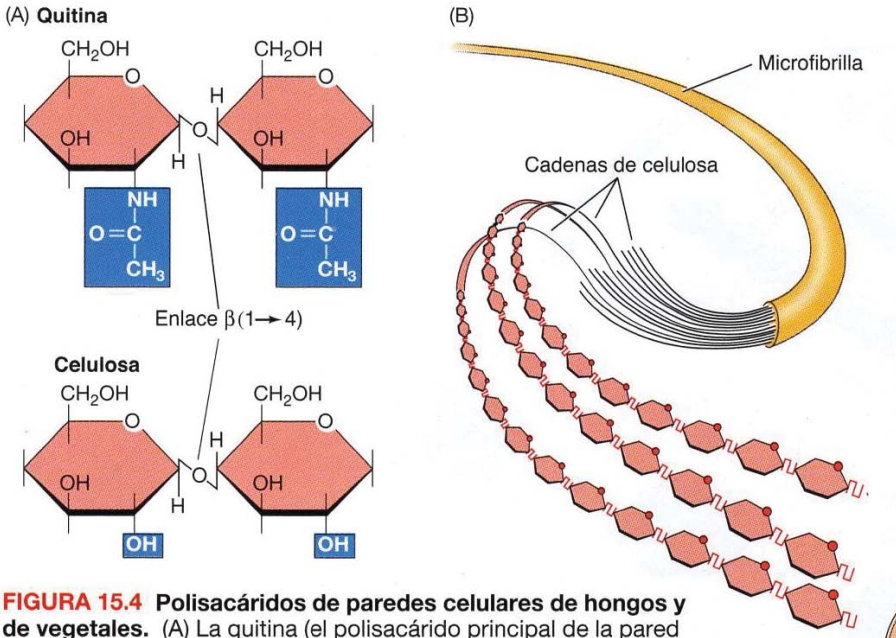


FIGURA 15.4 Polisacáridos de paredes celulares de hongos y de vegetales. (A) La quitina (el polisacárido principal de la pared celular de los hongos) es un polímero lineal de restos de *N*-acetilglucosamina, mientras que la celulosa es un polímero lineal de glucosa. Los monómeros de carbohidrato se unen por enlaces β(1→4), permitiendo a los polisacáridos formar cadenas largas y rectas. (B) Las cadenas paralelas de celulosa se asocian para formar microfibrillas.

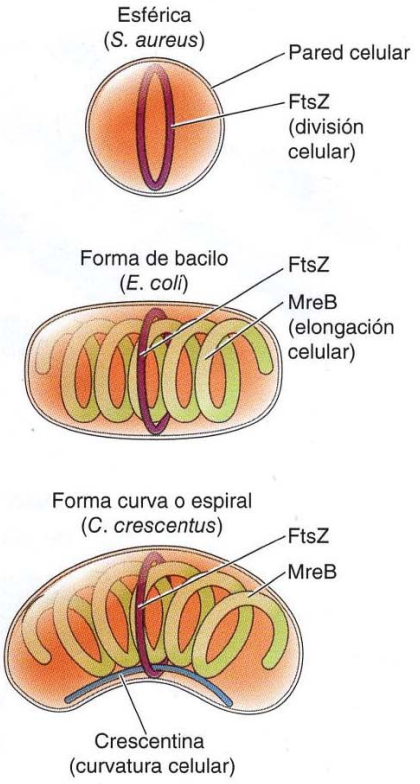


FIGURA 15.3 Las proteínas citoesqueléticas bacterianas regulan la síntesis de la pared celular. FtsZ, un homólogo de la tubulina eucariótica, forma una estructura anular en el lugar de la división celular y dirige la síntesis de una nueva pared celular entre células hijas. Está presente en bacterias esféricas en forma de bacilo y espirales. Las bacterias en forma de bacilo contienen también MreB, un homólogo de la actina que dirige la síntesis de la pared celular durante la elongación celular. Las proteínas relacionadas con filamentos intermedios (p. ej., crescentina) son responsables de la curvatura de la pared celular en las bacterias curvas o espirales.

ilustrativo de sus propiedades gelificantes lo muestra el hecho de que las mermeladas y las gelatinas se producen añadiendo pectinas al zumo de frutas. Finalmente, las paredes celulares contienen varias glicoproteínas que se incorporan a la matriz y que se cree que proporcionan un mayor soporte estructural.

Tanto la estructura como la función de la pared celular varían a medida que las células vegetales se desarrollan. La pared de las células vegetales en crecimiento (denominada **pared celular primaria**) es relativamente delgada, lo que permite a la célula crecer en tamaño. Una vez que las células han

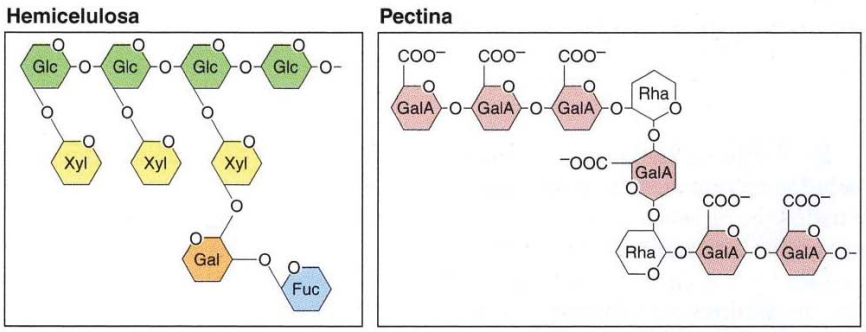


FIGURA 15.5 Estructuras de una hemicelulosa y de una pectina. Una hemicelulosa (xiloglucano) representativa consiste en una rama de residuos de glucosa (Glc) con cadenas laterales de xilosa (Xyl), galactosa (Gal) y mucosa (Fuc). Una pectina representativa (ramnogalacturonano) consiste en una estructura central de ácido glucurónico (GalA) y ramnosa (Rha) a los que también se unen numerosas cadenas laterales.

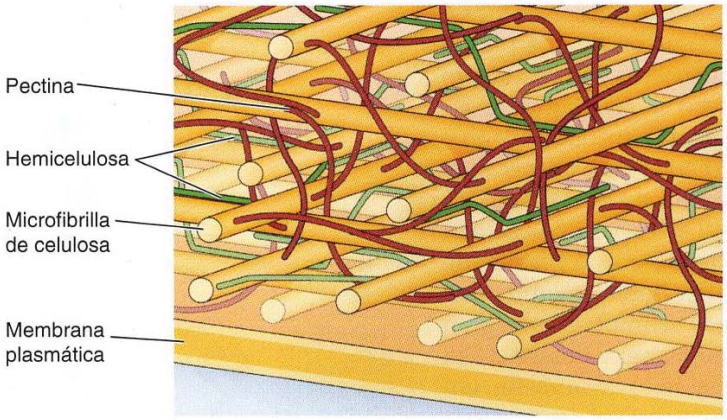
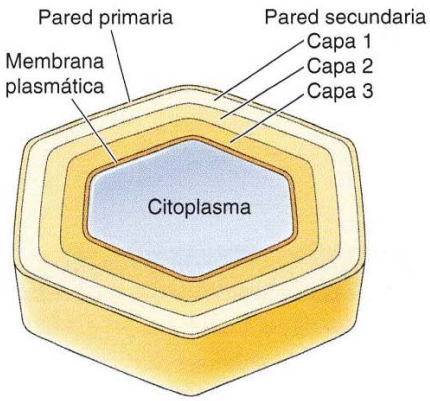
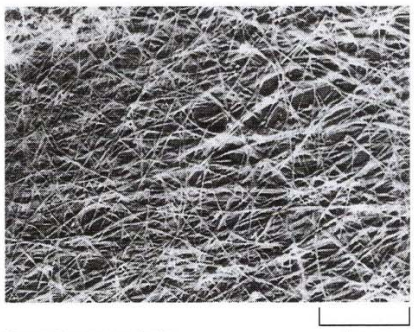


FIGURA 15.6 Modelo de una pared celular vegetal. La celulosa está organizada en microfibrillas que se encuentran orientadas en láminas. Las hemicelulosas (verde) están estrechamente asociadas con las microfibrillas de celulosa; ambas están inmersas en una matriz tipo gel formada por pectinas (rojo).

cesado su crecimiento, suelen desarrollar una **pared celular secundaria** entre la membrana plasmática y la pared celular primaria (**Fig. 15.7**). Las paredes celulares primarias y secundarias se diferencian en cuanto a su composición, además del espesor. Las paredes celulares primarias contienen cantidades aproximadamente iguales de celulosa, hemicelulosas y pectinas. Sin embargo, las paredes secundarias, más rígidas, generalmente carecen de pectinas. Muchas paredes secundarias tienen el refuerzo extra de la **lignina**, un polímero complejo de residuos fenólicos hidrófobos, que se inserta entre los espacios presentes entre los demás polímeros. La lignina es la responsable de buena parte de la solidez y densidad de la madera. En vez de formar un gel, la lignina deshidrata la pared celular, sellándola y haciéndola resistente a la degradación por parte de los patógenos, lo que permite a los árboles vivir cientos de años. La orientación de las microfibrillas de celulosa también es distinta en las paredes celulares primarias y secundarias. Las fibras de celulosa de las paredes primarias parecen estar dispuestas al azar, mientras que las correspondientes a la pared secundaria están muy ordenadas (véase Fig. 15.7). Las paredes secundarias se disponen a menudo en capas con distinta orientación de las fibras de celulosa, formando una estructura laminada que aumenta sobremanera la solidez de la pared celular. Estas paredes celulares secundarias, más gruesas y rígidas que las primarias, resultan especialmente importantes en los tipos celulares encargados de conducir el agua y proporcionar fuerza mecánica a la planta.

Una de las funciones críticas de las paredes celulares vegetales es impedir que la célula se hinche como resultado de la presión osmótica. A diferencia de las células animales, las células vegetales (como bacteria) no mantienen un equilibrio osmótico entre su citosol y los fluidos extracelulares. Como consecuencia, la presión osmótica dirige continuamente el flujo de agua hacia el interior de la célula. Las células vegetales toleran este flujo de agua hacia el interior debido a que sus paredes celulares rígidas impiden que la célula se hinche y estalle. En su lugar, se genera una presión hidrostática interna (llamada **presión de turgencia**), que acaba por igualar a la presión osmótica e impide que el agua siga entrando.





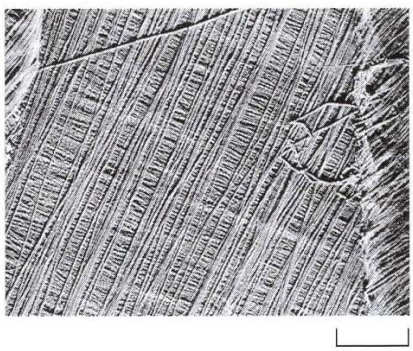


FIGURA 15.7 Paredes celulares primaria y secundaria. La pared celular secundaria se dispone entre la pared celular primaria y la membrana plasmática. La pared secundaria suele estar constituida por tres capas, que difieren en la orientación de sus microfibrillas de celulosa. Las micrografías electrónicas muestran las microfibrillas de celulosa en la pared celular primaria y secundaria. (Pared primaria, cortesía de F. C. Steward).

La presión de turgencia es la principal responsable de la rigidez de los tejidos vegetales, como resulta aparente tras la observación de una planta deshidratada y marchita. Además, la presión de turgencia es el fundamento de un mecanismo de crecimiento celular que es único en las plantas. Concretamente, las células vegetales suelen crecer debido a la entrada de agua, sin sintetizar nuevos componentes citoplasmáticos (**Fig. 15.8**). Este mecanismo de crecimiento celular está señalizado por hormonas vegetales (**auxinas**) y activan proteínas denominadas expansinas. Las expansinas actúan debilitando una región de la pared celular, permitiendo que la presión de turgencia dirija la expansión de la célula en esa dirección. A medida que esto ocurre, el agua que fluye al interior de la célula se acumula en una gran vacuola central, por lo que la célula crece sin incrementar el volumen de su citosol. Este tipo de crecimiento puede dar como resultado un aumento entre 10 y 100 veces el tamaño de las células vegetales durante el desarrollo.

A medida que las células crecen, se van depositando nuevos componentes de la pared celular por fuera de la membrana plasmática. Los componentes de la matriz, incluyendo hemicelulosas y pectinas, se sintetizan en el aparato de Golgi y son secretados. La celulosa, sin embargo, es sintetizada por un complejo enzimático de la membrana plasmática **celulosa sintasa** (**Fig. 15.9**). La celulosa sintasa es una enzima transmembrana que sintetiza celulosa a partir de UDP-glucosa en el citosol. La cadena de celulosa en crecimiento permanece unida a la enzima a medida que es sintetizada y translocada a través de la membrana plasmática al exterior de la célula a través de un poro creado por múltiples subunidades enzimáticas. Se emplea un mecanismo similar para sintetizar quitina y ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular analizado más adelante en este capítulo.

En las células en expansión, las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas son depositadas formando un ángulo recto con respecto a la dirección de elongación celular —una orientación que determina la dirección de expansión celular—. Es interesante señalar que las microfibrillas de celulosa en las paredes celulares en expansión están dispuestas paralelamente a los

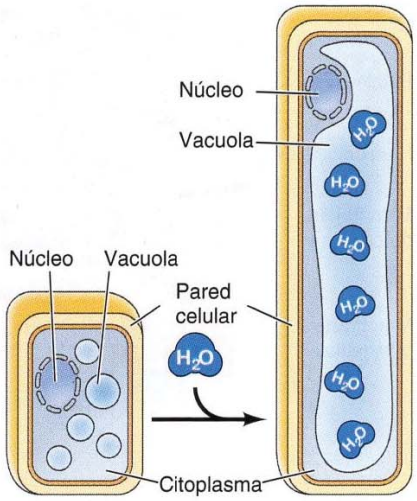


FIGURA 15.8 Crecimiento de las células vegetales. La presión de turgencia dirige la expansión de las células vegetales durante el crecimiento mediante la entrada de agua, que se acumula en una gran vacuola central.

ANIMACIÓN 15.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a15.1

Síntesis de celulosa durante la elongación. La formación de la pared celular en las plantas requiere la síntesis de cadenas de celulosa por parte de complejos enzimáticos localizados en la membrana plasmática.

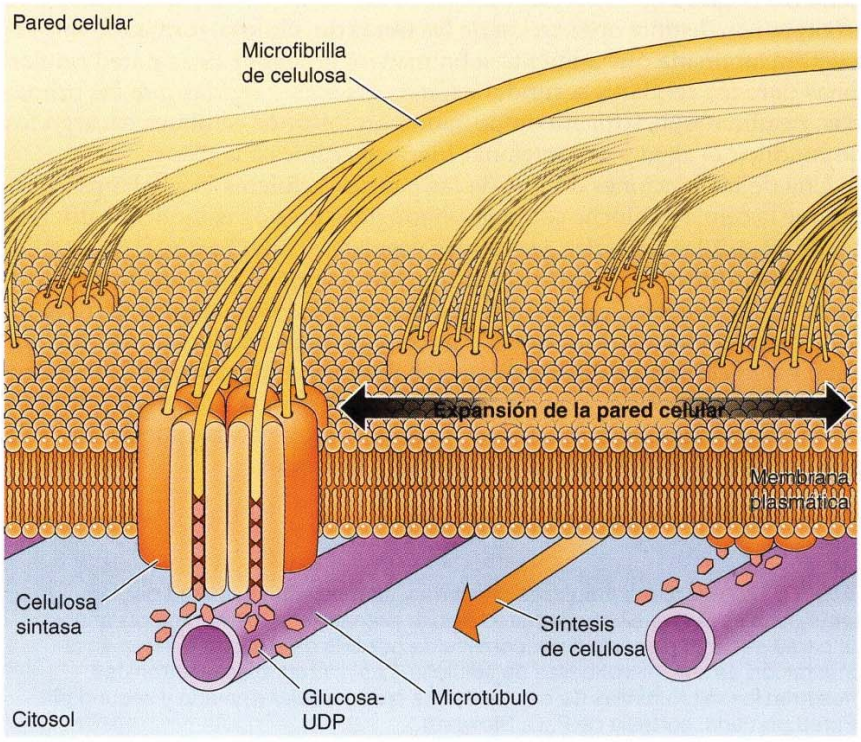


FIGURA 15.9 Síntesis de celulosa durante la elongación celular. Las celulosa sintasas son enzimas transmembrana que sintetizan celulosa a partir de UDP-glucosa. La UDP-glucosa se une a la celulosa-sintasa en el citosol, y la cadena de celulosa creciente se desplaza al exterior de la célula. Los complejos de celulosa-sintasa siguen a los microtúbulos situados por debajo de la membrana plasmática, de tal modo que las microfibrillas de celulosa nuevas se disponen en ángulo recto respecto a la dirección de elongación de la célula.

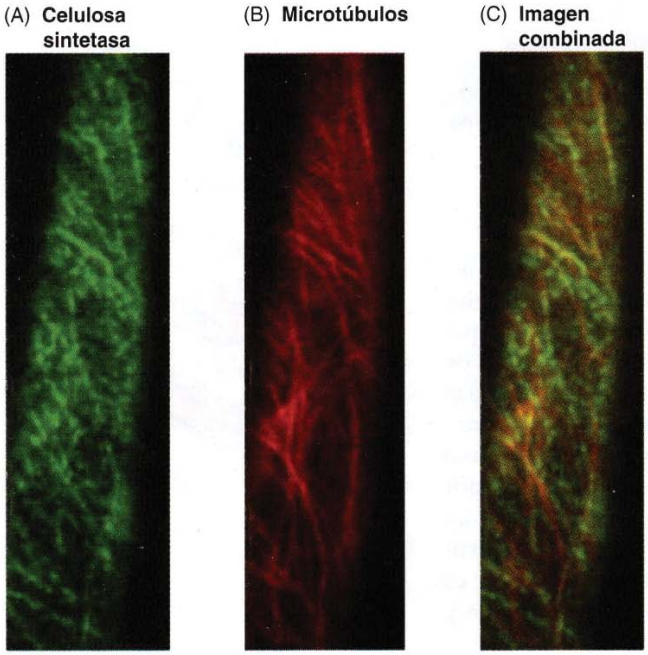


FIGURA 15.10 Movimiento de la celulosa sintetasa a lo largo de los microtúbulos. En la imagen se puede visualizar la asociación de la celulosa sintetasa (fluorescencia verde) con los microtúbulos (fluorescencia roja) en células de brotes de *Arabidopsis*. Las imágenes tomadas con un intervalo de 20 segundos revelan el movimiento del complejo a lo largo de los microtúbulos. En la imagen mixta se combinan las imágenes de la celulosa sintetasa y los microtúbulos para mostrar su co-localización. (Tomado Paredez, A., A. Wright y D. W. Ehrhardt. 2006. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 574.)

FIGURA 15.11 Efecto de la mutación de una proteína asociada a los microtúbulos sobre el crecimiento de *Arabidopsis*. La planta de la izquierda es normal. La planta de la derecha tiene una mutación en la proteína asociada a los microtúbulos CLASP, que interfiere con la expansión y el crecimiento normales de las células. (Por cortesía de Chris Ambrose, Universidad de Saskatchewan).

microtúbulos corticales que subyacen la membrana plasmática. Estos microtúbulos determinan la orientación de las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas al orientar el movimiento de los complejos de la celulosa sintetasa en la membrana (**Fig. 15.10**). Los microtúbulos corticales definen así la dirección del crecimiento de la pared celular, lo cual a su vez determina la dirección de la expansión celular y finalmente la forma de toda la planta. Esto queda reflejado en el efecto de una mutación de la proteína asociada a los microtúbulos CLASP sobre el crecimiento de *Arabidopsis*. La CLASP se une a los extremos «más» de los microtúbulos para regular su estabilidad y seguir a la membrana plasmática (descrito en el capítulo 13). La inactivación de esta proteína interfiere con la expansión celular, con el resultado de plantas atrofiadas (**Fig. 15.11**).

Las paredes celulares de diferentes tejidos vegetales, como las hojas, tallos, raíces y flores, están formadas principalmente por celulosa, pero difieren en sus componentes de matriz y en la organización de las fibrillas de celulosa. Las especies vegetales expresan de nueve a 18 enzimas celulosa sintetasa diferentes y cada complejo de ellas contiene, al menos, tres formas distintas, lo que hace posible la organización diferente de las paredes celulares en los diversos tejidos.

Matriz extracelular e interacciones célula-matriz

Aunque las células animales no están rodeadas por paredes celulares, muchas de las células en los tejidos de los organismos pluricelulares se encuentran embebidas en una **matriz extracelular** constituida por proteínas secre-

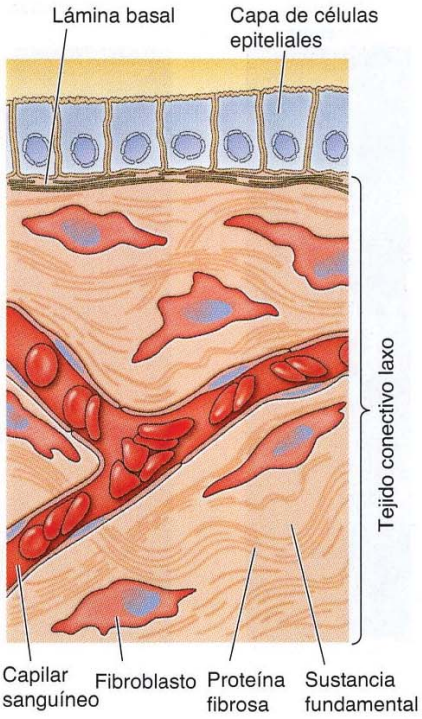


FIGURA 15.12 Ejemplos de matriz extracelular. Las láminas de células epiteliales descansan sobre una capa delgada de matriz extracelular llamada lámina basal. Bajo la lámina basal está el tejido conectivo laxo, que consiste fundamentalmente en matriz extracelular secretada por los fibroblastos. La matriz extracelular contiene proteínas fibrosas estructurales embebidas en una sustancia fundamental gelatinosa, de naturaleza polisacarídica.

tadas y polisacáridos. La matriz extracelular rellena los espacios entre las células y une entre sí las células y los tejidos. Un tipo de matriz extracelular es la **lámina basal**, previamente denominada *membrana basal*, sobre la que descansan las células epiteliales (**Fig. 15.12**). Además de sostener láminas de células epiteliales, la lámina basal rodea a las células musculares, células adiposas y nervios periféricos. La matriz extracelular, sin embargo, es más abundante en los tejidos conectivos. Por ejemplo, el tejido conectivo laxo bajo las capas de células epiteliales está constituido fundamentalmente por una matriz extracelular en la cual se distribuyen los fibroblastos. De igual manera, otros tipos de tejido conectivo, como el hueso, el tendón y el cartílago, están constituidos fundamentalmente por matriz extracelular, que es la responsable principal de su estructura y función. Varias de las proteínas y polisacáridos encontrados en la matriz extracelular también están estrechamente asociados con la membrana plasmática donde forman una capa rica en polisacáridos denominada glicocáliz (véase Fig. 14.11).

Proteínas estructurales de la matriz

La matriz extracelular está compuesta por proteínas fibrosas, resistentes, embebidas en una sustancia fundamental gelatinosa y de naturaleza polisacarídica —un diseño similar al de la pared de las células vegetales—. Además de las proteínas estructurales fibrosas y de los polisacáridos, la matriz extracelular contiene proteínas de adhesión que unen los componentes de la matriz tanto entre sí como a las células adyacentes. Las diferencias entre los distintos tipos de matriz extracelular se deben a variaciones cuantitativas en los tipos o cantidades de estos diferentes constituyentes y a modifi-

(A) **Triple hélice de colágeno** (B) **Secuencia de aminoácidos**

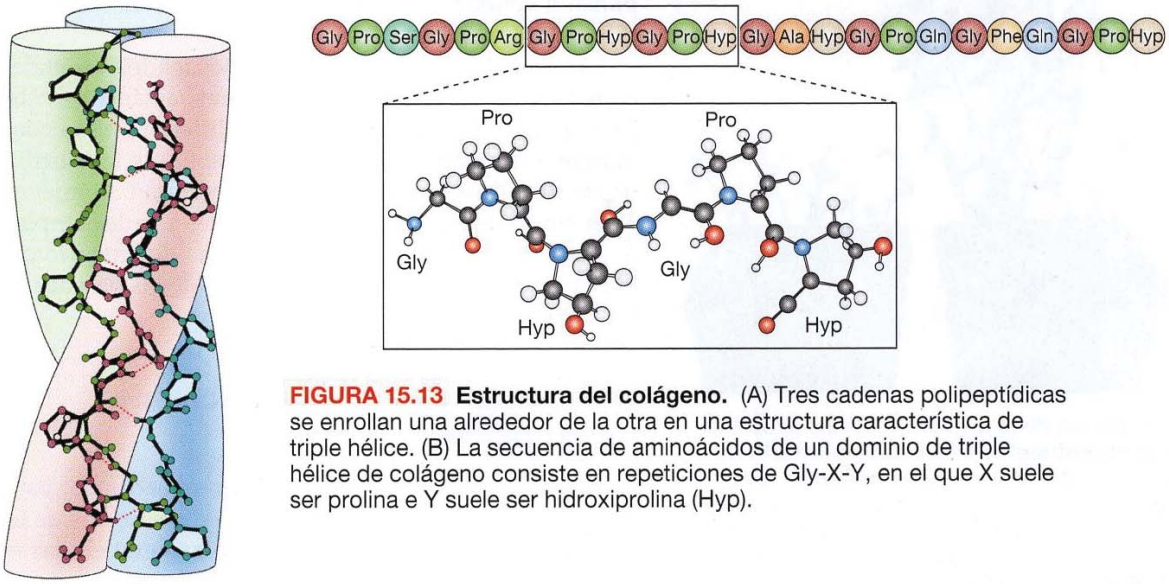


FIGURA 15.13 Estructura del colágeno. (A) Tres cadenas polipeptídicas se enrollan una alrededor de la otra en una estructura característica de triple hélice. (B) La secuencia de aminoácidos de un dominio de triple hélice de colágeno consiste en repeticiones de Gly-X-Y, en el que X suele ser prolina e Y suele ser hidroxiprolina (Hyp).

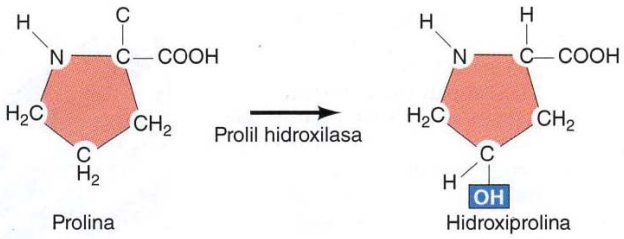


FIGURA 15.14 Formación de la hidroxiprolina. La prolina hidroxilasa convierte los restos de prolina del colágeno en hidroxiprolina.

◆ La prolil hidroxilasa, la enzima que cataliza la modificación de residuos de prolina en hidroxiprolina en el colágeno requiere la vitamina C para su actividad. La deficiencia de vitamina C causa escorbuto, un trastorno caracterizado por lesiones de la piel y hemorragias de los vasos sanguíneos como resultado de un tejido conectivo debilitado.

caciones en su organización. Por ejemplo, los tendones contienen una proporción elevada de proteínas fibrosas, mientras que el cartílago contiene una alta concentración de polisacáridos que forman un gel firme, resistente a la compresión. En el hueso, la matriz extracelular está endurecida por el depósito de cristales de fosfato cálcico. La estructura laminar de la lámina basal también se debe a unos componentes de la matriz que difieren de aquellos que se encuentran en tejidos conjuntivos.

La proteína estructural principal de la matriz extracelular es el **colágeno**, que es la proteína más abundante en los tejidos animales (**Fig. 15.13**). Los colágenos son una gran familia de proteínas, constituida por más de 40 miembros diferentes. Se caracterizan por formar hélices triples en las que tres cadenas polipeptídicas se enrollan estrechamente una alrededor de la otra en una estructura en forma de cuerda. Los dominios de triple hélice de los colágenos consisten en repeticiones de la secuencia de aminoácidos Gly-X-Y. Se requiere una glicina (el aminoácido más pequeño, con una cadena lateral constituida sólo por un hidrógeno) en cada tercera posición para que las cadenas polipeptídicas estén lo suficientemente agrupadas como para formar la triple hélice de colágeno. En la posición X suele aparecer la prolina, y la hidroxiprolina en la posición Y; debido a su estructura en anillo, estos aminoácidos estabilizan la conformación helicoidal de las cadenas polipeptídicas.

El aminoácido poco común hidroxiprolina se forma dentro del retículo endoplasmático a partir de la modificación de los restos de prolina que ya han sido incorporados a las cadenas polipeptídicas de colágeno (**Fig. 15.14**). Los restos de lisina en el colágeno suelen ser convertidos en hidroxilisinas. Se considera que los grupos hidroxilo de estos aminoácidos modificados estabilizan la triple hélice de colágeno formando enlaces de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas. Estos aminoácidos raramente se encuentran en otras proteínas, aunque la hidroxiprolina también es común en algunas de las glicoproteínas de las paredes celulares de las plantas. Existen 28 tipos diferentes de colágeno, con distintas funciones en las diversas clases de matrices extracelulares (**Tabla 15.1**). El tipo de colágeno más abundante (colág-

TABLA 15.1 Miembros representativos de la familia del colágeno

Clases de colágeno	Tipos	Papel
Formador de fibrillas	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII	Formación de fibras en la mayoría de los tejidos conjuntivos, entre ellos la piel, el hueso y el cartílago
Formación de redes	IV	Formación de láminas basales
Asociado a fibrillas	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI	Asociación de fibrillas de colágeno con otros componentes de matriz extracelular
Anclaje	VII	Fijación de láminas basales a tejido conjuntivo subyacente
Transmembrana	XIII, XVII, XXIII	Moléculas de la superficie celular con dominios transmembrana

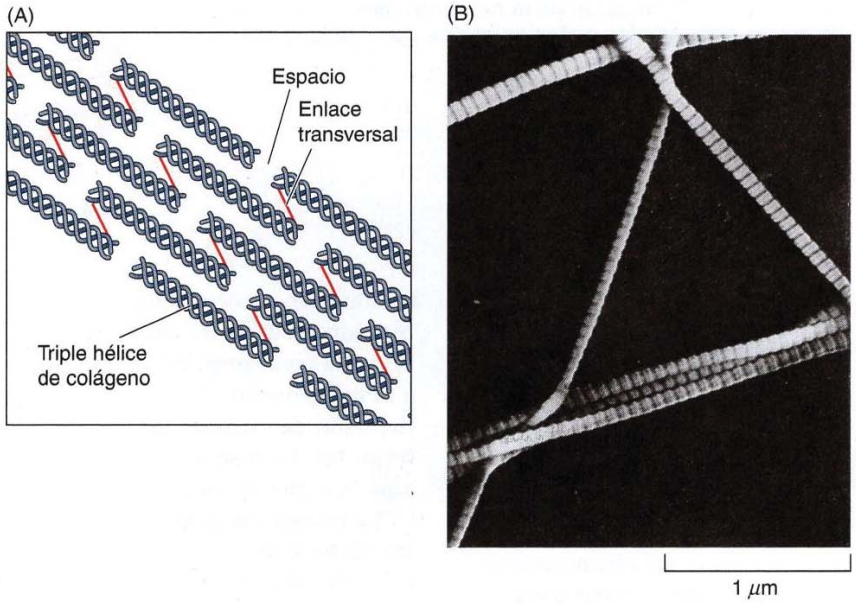


FIGURA 15.15 Fibrillas de colágeno. (A) Las moléculas de colágeno se ensamblan en una formación discontinua regular para constituir fibrillas. Las moléculas se superponen en una cuarta parte de su longitud, y hay un pequeño hueco entre el extremo N-terminal de una molécula y el extremo C-terminal de la siguiente. Esta estructura queda reforzada mediante enlaces covalentes transversales entre las cadenas laterales de los restos de lisina o de hidroxilisina, principalmente en los extremos de las moléculas. (B) Micrografía electrónica de fibrillas de colágeno. La disposición discontinua de las moléculas de colágeno y los huecos entre ellas son la causa de las estriaciones transversales características de las fibrillas.

no tipo I) es uno de los colágenos fibrilares, que son los componentes estructurales fundamentales de los tejidos conectivos. Las cadenas polipeptídicas de estos colágenos están constituidas por, aproximadamente, mil aminoácidos o 330 repeticiones de Gly-X-Y. Tras ser secretados de las células estos colágenos se ensamblan en **fibrillas de colágeno** en las que las moléculas de triple hélice se asocian en una estructura regular y discontinua (**Fig. 15.15**). Estas fibras no se forman dentro de la célula, porque los colágenos fibrilares se sintetizan como un precursor soluble (**procolágeno**) que contiene segmentos no helicoidales en ambos extremos de la cadena polipeptídica. El procolágeno se escinde para dar colágeno después de su secreción, de tal manera que el ensamblaje del colágeno en fibrillas sólo se produce fuera de la célula. La asociación de las moléculas de colágeno en fibrillas se refuerza debido a que se forman enlaces covalentes transversales entre las cadenas laterales de los restos de lisina e hidroxilisina. Frecuentemente, las fibrillas se asocian además unas con otras para formar fibras de colágeno, las cuales pueden tener varios micrómetros de diámetro.

Además de los colágenos fibrilares, los tejidos conectivos contienen colágenos asociados a fibrillas, que se unen a la superficie de las fibrillas del colágeno y las conectan entre sí y a otros componentes de la matriz (véase Tabla 15.1). Las láminas basales están constituidas por el colágeno de tipo IV que forma redes de colágeno (**Fig. 15.16**). Las repeticiones de Gly-X-Y del colágeno de tipo IV se interrumpen frecuentemente por pequeñas secuencias no helicoidales. Debido a estas interrupciones, el colágeno de tipo IV formador de redes es más flexible que los colágenos formadores de fibrillas. Como consecuencia, se ensamblan en redes entrelazadas bidimensionales en lugar de en fibrillas. Otro tipo de colágeno forma fibrillas de anclaje que anclan a algunas láminas basales con

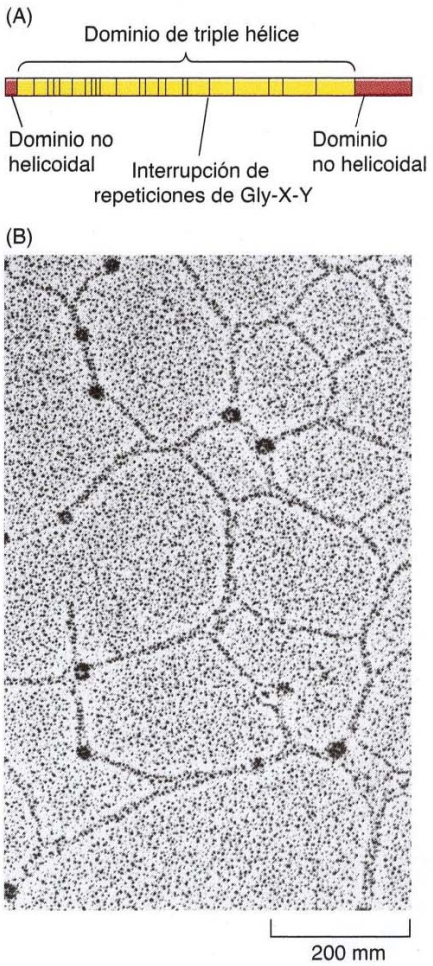


FIGURA 15.16 Colágeno tipo IV. (A) La estructura repetida de Gly-X-Y del colágeno tipo IV (amarillo) está interrumpida por múltiples secuencias no helicoidales (barras). (B) Micrografía electrónica de una red de colágeno tipo IV. (B, P. D. Yurchenco y J. C. Schittny, 1990. *FASEB J.* 4:1577.)

el tejido conectivo subyacente. Otros tipos de colágeno forman fibrillas de anclaje, que unen las láminas basales a los tejidos conjuntivos subyacentes, y algunos colágenos son proteínas transmembrana que participan en las interacciones célula-matriz.

Los tejidos conectivos también contienen **fibras elásticas**, que son particularmente abundantes en aquellos órganos que, regularmente, se extienden y después retornan a su forma original. Los pulmones, por ejemplo, se extienden con cada inspiración y retornan a su forma original con cada exhalación. Las fibras elásticas se componen principalmente de una proteína denominada **elastina** que forma una red, con puentes cruzados mediante enlaces covalentes entre las cadenas laterales de restos de lisina (similares a los del colágeno). Esta red de cadenas de elastina entrelazadas se comporta como una goma elástica, estirándose con la tensión y retornando de golpe a su forma inicial cuando dicha tensión se libera.

Polisacáridos de matriz

Las proteínas estructurales fibrosas de la matriz extracelular están embebidas en un gel formado a partir de unos polisacáridos denominados **glicosaminoglicanos**, o **GAG**, que están constituidos por unidades repetidas de disacáridos (**Fig. 15.17**). Uno de los azúcares del disacárido puede ser *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina y el segundo suele ser un ácido (bien ácido glucurónico o ácido idurónico). Con la excepción del ácido hialurónico, estos azúcares se modifican por la adición de grupos sulfato. Por tanto, los GAG tienen una carga negativa elevada. Al igual que las pectinas de las paredes celulares vegetales, se unen a iones cargados positivamente y atrapan moléculas de agua para formar geles hidratados, proporcionando así un soporte mecánico a la matriz extracelular. Los GAG son dermatán sulfato, condrotín sulfato, queratán sulfato y heparán sulfato.

El ácido hialurónico es el único GAG que aparece como una única cadena larga de polisacárido. De forma semejante a la celulosa, la quitina es sintetizada en la membrana plasmática por una hialurónico sintasa transmembrana. Todos los demás GAG se unen a proteínas para formar **proteo-**

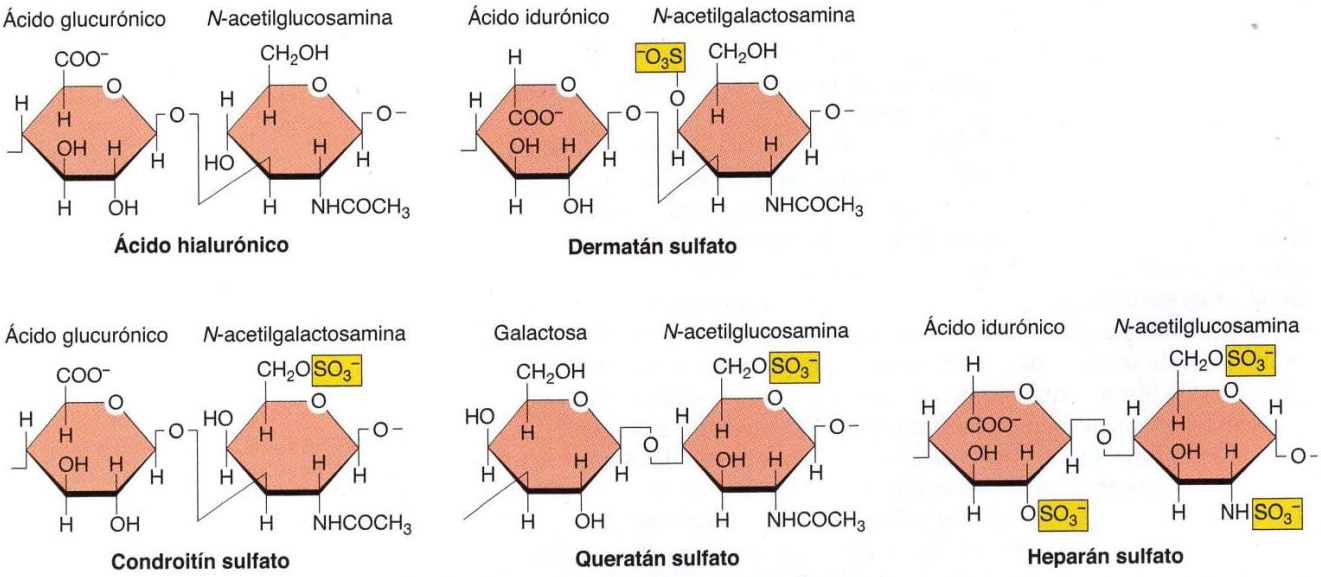


FIGURA 15.17 Tipos principales de glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos (GAG) están constituidos por la repetición de unidades de disacáridos. Con la excepción del ácido hialurónico, los azúcares suelen contener sulfato.

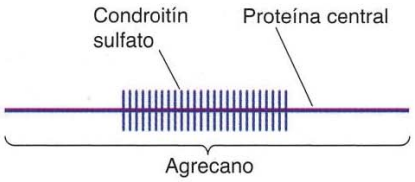
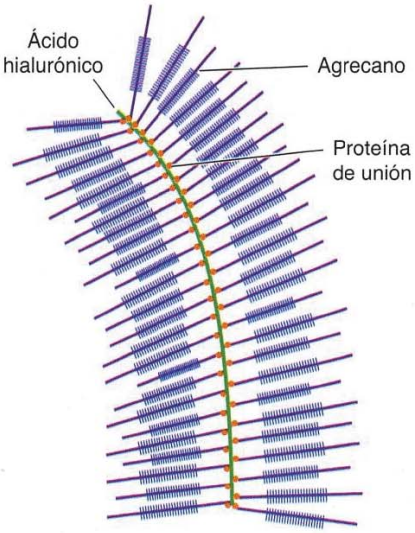


FIGURA 15.18 Complejos de agrecano y ácido hialurónico. El agrecano es un gran proteoglicano constituido por más de 100 cadenas de condroitín sulfato unidas a una proteína central. Múltiples moléculas de agrecano se unen a largas cadenas de ácido hialurónico, formando grandes complejos en la matriz extracelular del cartílago. Esta asociación se estabiliza por proteínas de unión.

glicanos, que están constituidos hasta por un 95% de polisacáridos en peso. Los proteoglicanos pueden contener desde solamente una o hasta más de cien cadenas de GAG unidas a restos de serina de una proteína central. Se han identificado varias proteínas centrales (que abarcan desde 10 a >500 kDa), por lo que los proteoglicanos son un grupo diverso de macromoléculas. Además de ser componentes de la matriz extracelular, algunos proteoglicanos como los sindecanos (con α-hélices transmembrana) y glipicanos (con anclajes de GPI) son proteínas de la superficie celular que intervienen en la adhesión celular. Algunos de estos proteoglicanos son proteínas de la superficie celular que funcionan junto con las integrinas en la adhesión célula-célula y célula-matriz.

Algunos proteoglicanos interaccionan con el ácido hialurónico para formar grandes complejos en la matriz extracelular. Un ejemplo bien conocido es el agrecano, el principal proteoglicano del cartílago (**Fig. 15.18**). Más de cien cadenas de condroitín sulfato se unen a una proteína central de aproximadamente 250 kDa, formando un proteoglicano de casi 3.000 kDa. Múltiples moléculas de agrecano se asocian con cadenas de ácido hialurónico, constituyendo grandes agregados (>100.000 kDa) que quedan atrapados en la red de colágeno. Los proteoglicanos también interaccionan con el colágeno y con otras proteínas de la matriz para formar redes gelatinosas en las que las proteínas estructurales fibrosas de la matriz extracelular están embebidas. Por ejemplo, el perlecano (el principal proteoglicano heparán sulfato de la lámina basal) se une tanto al colágeno tipo IV como a la proteína de adhesión laminina, que se describirá posteriormente.



◆ Los venenos de las serpientes contienen proteínas denominadas desintegrinas, que se unen a las integrinas e interfieren con su capacidad de unión a proteínas de la matriz extracelular. Al degradar estas conexiones entre las células y la matriz extracelular ayudan a las serpientes a digerir sus presas.

Proteínas de adhesión

Las proteínas de adhesión, la tercera clase de constituyentes extracelulares de la matriz, son responsables de unir los componentes de la matriz entre sí y a las superficies celulares. Interaccionan con el colágeno y los proteoglicanos con el fin de especificar la organización de la matriz, y son los lugares de unión principales para receptores de la superficie celular como las integrinas (descritas en la próxima sección).

El prototipo de estas moléculas es la **fibronectina**, que es la principal proteína de adhesión de los tejidos conectivos. La fibronectina es una glicoproteína dimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas, conteniendo cada una cerca de 2.500 aminoácidos (**Fig. 15.19**). Además, la fibronectina se dispone en la matriz extracelular a modo de una red de fibrillas. La fibronectina tiene sitios de unión para el colágeno y para los proteoglicanos, por lo que actúa como un puente de unión entre estos componentes de la matriz. Un sitio distinto de la molécula de fibronectina es reconocido por integrinas. Las proteínas de fibronectina varían enormemente de un tejido a otro pero todos derivan del procesamiento alternativo del ARNm de un solo gen.

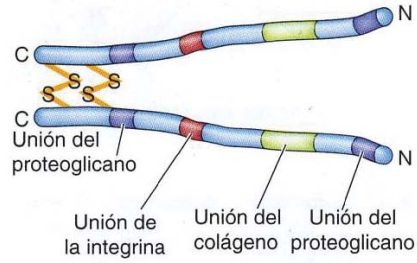


FIGURA 15.19 Estructura de la fibronectina. La fibronectina es un dímero de cadenas polipeptídicas similares unidas por puentes disulfuro cerca del extremo C-terminal. Se indican los sitios de unión para proteoglicanos, células y colágeno. La molécula también contiene sitios adicionales de unión que no se muestran.

Los componentes fundamentales de las láminas basales son proteínas de adhesión diferenciadas pertenecientes a la familia de las **laminínas** (**Fig. 15.20**), que son las organizadoras principales del ensamblaje de la lámina basal. Las laminínas son heterotrímeros en forma de cruz o T de subunidades α, β, y γ, productos de cinco genes α, cuatro β y tres γ. Al igual que el colágeno tipo IV, las laminínas son capaces de autoensamblarse en redes de forma de malla. Las distintas subunidades de la laminina también poseen lugares

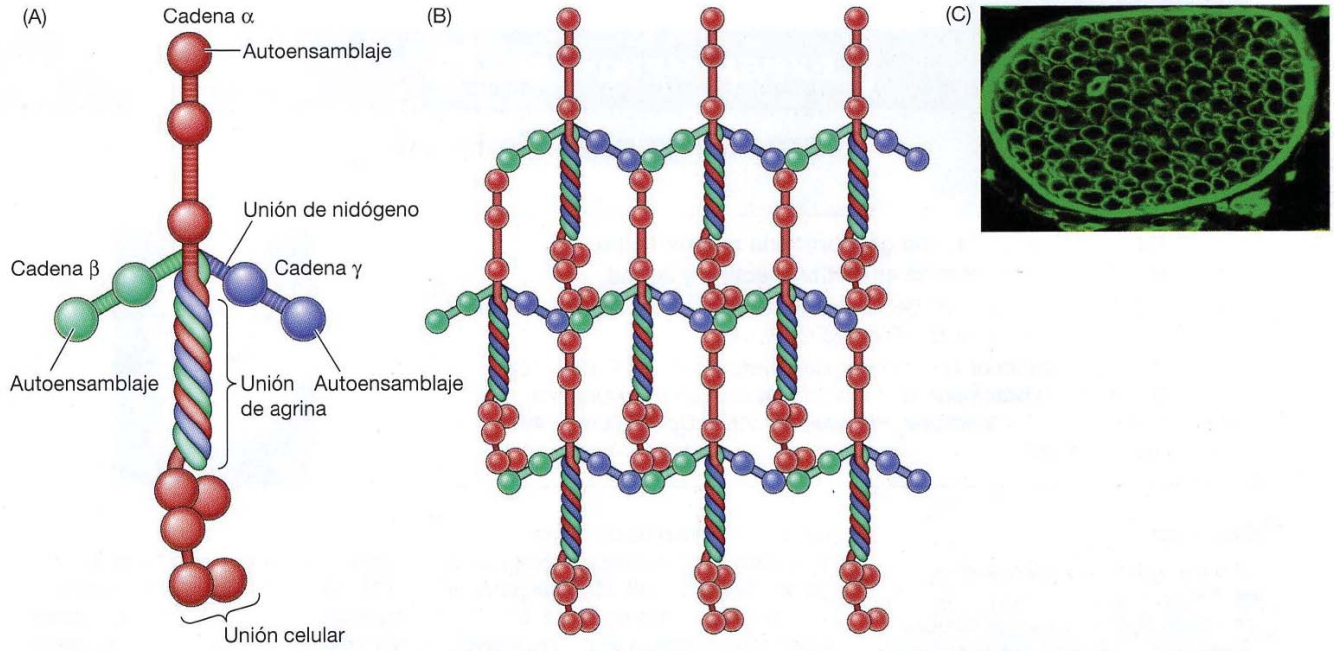


FIGURA 15.20 Lamininas. (A) Las lamininas constan de tres cadenas polipeptídicas designadas como α, β y γ. Cada polipéptido presenta dominios en forma de bastón con dominios globulares intercalados. Las cadenas polipeptídicas se unen en una región de triple hélice formada por los dominios en forma de bastón. Se indican algunos de los sitios de unión del nidógeno, los proteoglicanos y los receptores de superficie celular. (B) Ensamblaje de las láminas en una red. (C) Red de láminas en la lámina basal rodeando un nervio, teñida con anticuerpo fluorescente contra la cadena de láminas β. (Tomado de Durbeej, M. 2010, *Cell Tissue Res.* 339: 262.)

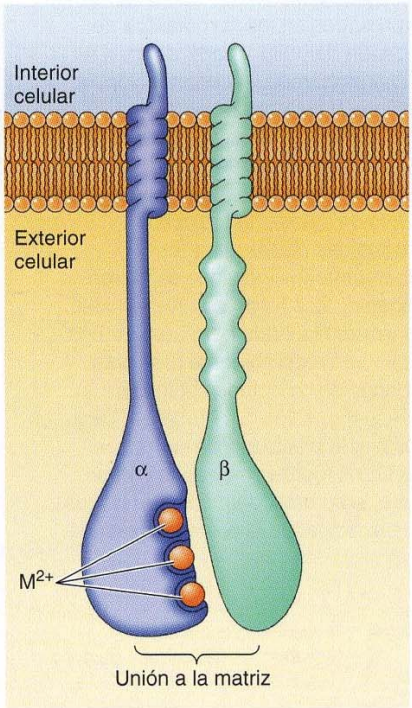
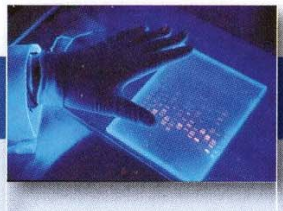


FIGURA 15.21 Estructura de las integrinas. Las integrinas son heterodímeros de dos subunidades transmembrana, designadas α y β. La subunidad α fija cationes divalentes (M^{2+}). La zona de unión a la matriz se compone de porciones de ambas subunidades.

de unión para receptores de la superficie celular (p. ej., integrinas), y para proteoglicanos. Además, las lamininas están asociadas estrechamente con otra proteína de adhesión, denominada **nidógeno**, que también se une al colágeno tipo IV. Como resultado de estas múltiples interacciones, la laminina, el nidógeno, colágeno y los proteoglicanos forman redes entrecruzadas en las láminas basales. Como los distintos trímeros de laminina muestran una distribución específica según el tejido, no es sorprendente que las mutaciones de los genes de lamininas sean responsables de muchas enfermedades congénitas humanas, entre ellas una forma de distrofia muscular.

Interacciones célula-matriz

Los principales receptores celulares de superficie responsables de la unión de las células a la matriz extracelular son las **integrinas**. Las integrinas son una familia de proteínas transmembrana constituidas por dos subunidades, designadas α y β (**Fig. 15.21**) y las combinaciones de 18 subunidades α y ocho subunidades β dan lugar a más de 24 integrinas distintas. Las integrinas se unen a secuencias cortas de aminoácidos presentes en múltiples componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno, fibronectina y laminina. El primero de tales sitios de unión a las integrinas en ser caracterizado fue la secuencia Arg-Gly-Asp, que es reconocida por varios miembros de la familia de las integrinas. Otras integrinas, sin embargo, se unen a secuencias peptídicas diferentes, incluyendo las secuencias de reconocimiento de los colágenos, laminita y varios proteoglicanos. Los proteoglicanos transmembrana de la superficie de varias células también se unen a los componentes de la matriz extracelular y modulan las interacciones célula-matriz.



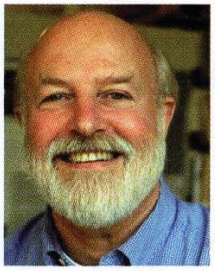
EXPERIMENTO CLAVE

Caracterización de la integrina

Estructura de la integrina, una glicoproteína que participa en la relación transmembrana entre fibronectina y actina

John W. Tamkun, Douglas W. DeSimone, Deborah Fonda, Ramila S. Patel, Clayton Buck, Alan F. Horwitz y Richard O. Hynes

Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (JWT, DWD, DF, RSP y ROH), The Wistar Institute, Philadelphia (CB) and The University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia (AFH) *Cell*, Volumen 46, 1986, págs. 271-282



Richard O. Hynes

Contexto

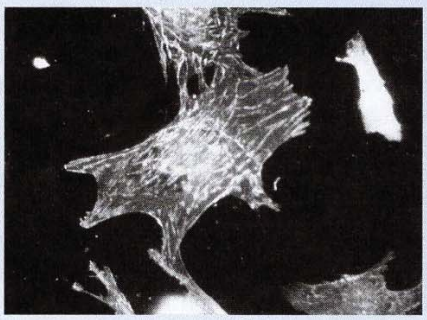
La base molecular de la adhesión celular a la matriz extracelular ha sido de interés para los biólogos celulares desde que se observó que la adhesión a la matriz estaba reducida en células cancerosas, potencialmente relacionado con su crecimiento anómalo y su capacidad para metastatizar o extenderse por el cuerpo. Al final de los años 1970 y primeros 1980 el trabajo de varios laboratorios, incluyendo el de Richard Hynes, estableció que existía una relación física entre las fibras de estrés del citoesqueleto de actina y la fibronectina en la matriz extracelular. Muchas de las proteínas citoesqueléticas implicadas en esta relación, incluyendo vinculina y talina, habían sido identificados, pero las proteínas transmembrana críticas que unían a las células con la matriz extracelular seguían siendo desconocidas.

Los candidatos para proteínas transmembrana implicadas en la adhesión celular a la matriz extracelular han sido identificadas empleando anticuerpos preparados por diversos grupos de científicos, incluyendo a Alan Horwitz y Clayton Buck. Estos anticuerpos reconocían un complejo de glicoproteínas de 140 kDa que parecían ser proteínas transmembrana. La inmunofluorescencia y la microscopia inmunoelectrónica localizaron a estas glicoproteínas en puntos de adhesiones celulares a la matriz. Estudios adicionales mostraron que las glicoproteínas de 140 kDa se unían a fibronectina y estaban implicadas en la adhesión celular. Así, parecía que estas glicoproteínas de 140 kDa eran probables candidatos para ser proteínas transmembrana responsables de la adhesión célula-matriz. En los experimentos descritos por Tamkun y cols., estos anticuerpos fueron empleados para aislar un clon molecular que codificaba una de estas glicoproteínas, proporcionando así la primera caracterización molecular de una integrina.

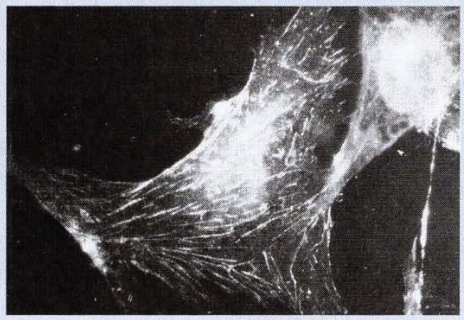
Experimentos

Para aislar un clon molecular que codificaba una de las glicoproteínas de 140 kDa, Tamkun y cols. prepararon una biblioteca de ADNc a partir de ARNm de fibroblastos procedentes de embrión de pollo. Esta biblioteca de ADNc fue preparada en un vector de expresión de bacteriófago λ que dirigía la transcripción y traducción a niveles elevados de los insertos de ADNc eucarióticos en *E. coli* (véase Fig. 4.21). La biblioteca de ADNc contenía aproximadamente 100.000 insertos de ADNc independientes, suficiente para representar clones de todos los ARNm expresados en los fibroblastos de embrión de pollo a partir del cual se había preparado. A continuación, la biblioteca fue analizada con anticuerpos frente a las glicoproteínas de 140 kDa para identificar aquellos fagos recombinantes que portaban los ADNc de interés. Las placas producidas mediante fagos recombinantes individuales fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa, tal y como se haría para analizar una biblioteca recombinante mediante hibridación de ácidos nucleicos (véase Fig. 4.25). Sin embargo, para analizar la biblioteca de expresión, los filtros fueron analizados con un anticuerpo para identificar los clones que expresaban la proteína deseada.

(A)



(B)



Inmunofluorescencia de fibroblastos de embrión de pollo teñidos con el antisuero original frente al complejo de glicoproteínas de 140 kDa (A) o con anticuerpos purificados frente a la proteína expresada a partir de los clones de ADNc (B).

EXPERIMENTO CLAVE

Mediante este análisis con anticuerpos, Tamkun y cols. identificaron con éxito diversos clones recombinantes que expresaban proteínas que eran reconocidas por los anticuerpos frente a glicoproteínas de 140 kDa.

Su siguiente reto era determinar si los ADNc clonados codificaban efectivamente una o más de las glicoproteínas de 140 kDa. Con este fin emplean proteínas expresadas por los clones para purificar anticuerpos que reconocían las proteínas clonadas. Adicionalmente, inyectaron conejos con las proteínas clonadas para generar nuevos anticuerpos dirigidos específicamente frente a las proteínas codificadas por los ADNc clonados. Los anticuerpos resultantes reconocían una de las proteínas del complejo de 140 kDa procedentes de fibroblastos de embrión de pollo en ensayos de inmunoblot, estableciendo la relación entre los ADNc clonados con esta proteína. Adicionalmente, anticuerpos purificados frente a proteínas clonadas tiñeron células de forma similar al anticuerpo original en ensayos de inmunofluorescencia, generando un patrón de tinción que correspondía con los puntos de adhesión de fibras de estrés a la matriz extracelular (véase figura). Los resultados tanto del inmunoblot como de la inmunofluorescencia indicaban, por tanto, que los ADNc clonados codificaban una de las proteínas del complejo de glicoproteínas de 140 kDa.

A continuación el ADNc fue secuenciado y se encontró que codificaba una proteína que consistía en 803 aminoácidos. La proteína incluía una secuencia señal amino terminal y una aparente α hélice transmembrana de 23 aminoácidos hidrofóbicos cerca del extremo carboxilo. La secuencia predecía un dominio citosólico corto y un largo dominio extracelular que contenía múltiples sitios de glicosilación, consistente con la estructura esperada de la glicoproteína transmembrana.

Impacto

Hynes y sus colaboradores concluyeron que habían clonado un ADNc que codificaba una proteína transmembrana que funcionaba conectando la fibronectina de la matriz extracelular con el citoesqueleto. Nombraron a la proteína integrina «para denotar su papel como un complejo integral de membrana implicado en la asociación transmembrana entre la matriz extracelular y el citoesqueleto».

El clonaje inicial de la integrina dio lugar a nuestra actual comprensión de la base molecular de las uniones celulares estables. En las adhesiones focales, las integrinas asocian la matriz extracelular con los filamentos de actina. Adicionalmente, las integrinas median la adhesión de células epiteliales a la matriz extracelular en los hemidesmosomas donde se asocian la matriz extracelular con los filamentos intermedios. Así, como fue sugerido por Hynes y sus colaboradores, las integrinas juegan un papel general en la adhesión célula-matriz. Estudios posteriores han demostrado que las integrinas también juegan un papel importante como complejos señalizadores en las células, transduciendo señales desde el exterior celular para controlar múltiples aspectos del movimiento celular, la proliferación y la supervivencia (estudiado en el Cap. 16). La caracterización de las integrinas, por tanto, abrió la puerta no sólo a la comprensión de la naturaleza de la adhesión celular a la matriz, sino también a la dilucidación de nuevos mecanismos de señalización que regulan el comportamiento celular.

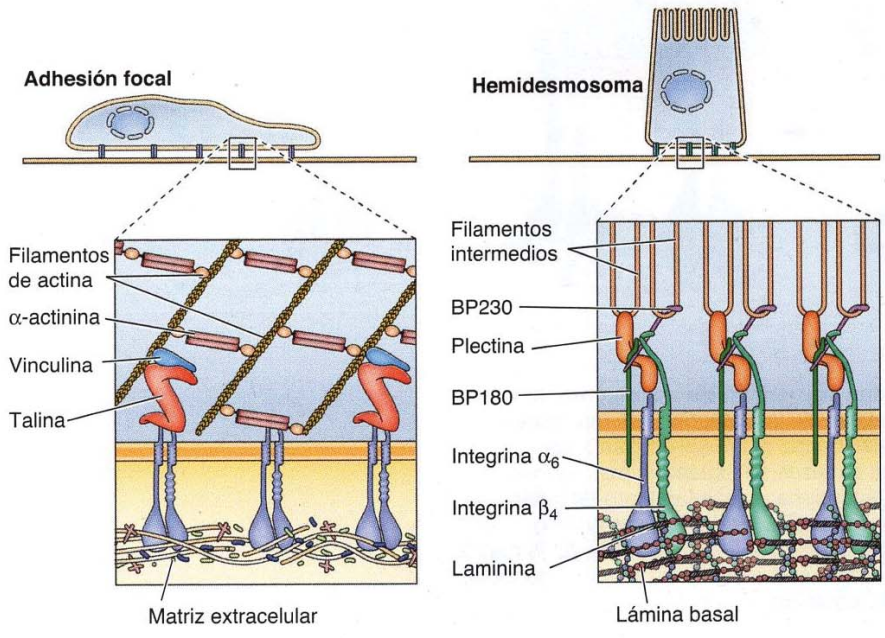


FIGURA 15.22 Uniones entre las células y la matriz extracelular. Las integrinas median dos tipos de uniones estables en las que el citoesqueleto se fija a la matriz extracelular. En las adhesiones focales, los haces de filamentos de actina se anclan a las subunidades β de la mayoría de las integrinas mediante asociaciones con otras proteínas, incluyendo α-actinina, talina y vinculina. En los hemidesmosomas, la integrina $\alpha_6\beta_4$ une la lámina basal a los filamentos intermedios a través de la plectina y BP230. BP180 funciona en el ensamblaje y estabilidad de los hemidesmosomas.

Además de fijar las células a la matriz extracelular, las integrinas sirven como anclaje para el citoesqueleto (**Fig. 15.22**). La unión del citoesqueleto a la matriz extracelular es la responsable de la estabilidad de las uniones célula-matriz. Distintos tipos de interacciones entre las integrinas y el citoesqueleto se encuentran en dos tipos de contactos célula-matriz, las **adhesiones focales** y los **hemidesmosomas**, que se describieron en el Capítulo 13. Las adhesiones focales anclan varios tipos celulares, incluyendo a los fibroblastos, a la matriz extracelular. En las adhesiones focales, los dominios citoplásmicos de las subunidades β de las integrinas anclan el citoesqueleto de actina mediante su asociación con paquetes de filamentos de actina a través de proteínas de unión a la actina como la α-actinina, vinculina y talina. Los hemidesmosomas median las uniones entre células epiteliales en las que una integrina específica (denominada $\alpha_6\beta_4$) se une a través de la plectina con los filamentos intermedios en lugar de con la actina. Esto está mediado por la larga cola citoplásmica de la subunidad β_4 de la integrina. La integrina $\alpha_6\beta_4$ se une a la laminina, de forma que los hemidesmosomas anclan las células epiteliales a la lámina basal.

Las modificaciones reguladas de la actividad de la integrina son las responsables del rápido ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales durante el movimiento celular (véase Fig. 13.20). La capacidad de las integrinas de unirse de forma reversible a componentes de la matriz depende de su capacidad de alternar de conformación entre estados inactivos y activos, que puede ser activada por señales del interior o el exterior de la célula. En el estado inactivo, las integrinas son incapaces de unirse a la matriz porque los grupos de la cabeza que contienen el lugar de unión al ligando se mantienen próximos a la superficie celular (**Fig. 15.23**). Cuando se activan, las integrinas pasan por un cambio de conformación que despliega los grupos de la cabeza en la matriz y permite la unión de ligandos. Esta interacción inicial de las integrinas con la matriz extracelular incorpora más inte-

VÍDEO 15.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v15.1

Adhesiones focales. Las adhesiones focales son grandes complejos de proteínas a través de los cuales se transmiten fuerzas mecánicas y señales reguladoras entre la matriz extracelular y una célula en interacción.

VÍDEO 15.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v15.2

Adhesiones dinámicas focales. El proceso dinámico de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales tiene un papel fundamental en la migración celular.

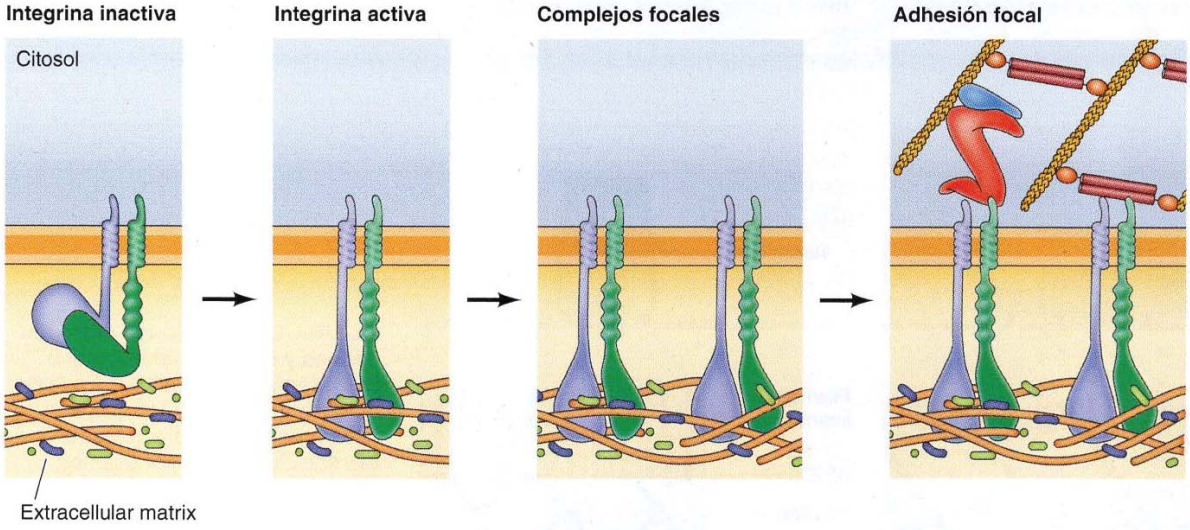


FIGURA 15.23 Activación de la integrina y formación de adhesiones focales. En su estado inactivo, los grupos de la cabeza de las integrinas se mantienen próximas a la superficie celular. Las señales desde el citosol activan a las integrinas, de forma que los grupos de las cabezas se extienden permitiendo su unión con la matriz extracelular. Esto desencadena el reclutamiento de integrinas adicionales y de la formación de adhesiones focales. En las células en migración, el cambio opuesto de conformaciones puede disociar a las integrinas de la matriz, esto da lugar a la incorporación de más integrinas para formar un complejo focal, que se transforma en una adhesión focal (véase Fig. 15.22).

◆ Las células cancerosas secretan proteasas que digieren proteínas de la matriz extracelular, permitiendo a las células cancerosas invadir los tejidos de alrededor y metastatizar a otras partes del cuerpo.

grinas al punto de adhesión, dando lugar al desarrollo de pequeños acúmulos de integrinas denominados **complejos focales.** A continuación, los complejos focales se transforman en adhesiones focales gracias a la incorporación de α-actinina, vinculina, talina y formina (que pone en marcha la formación de haces de actina; véase Fig. 13.4). Las adhesiones focales pueden ser interacciones muy estables implicadas en la estructura tisular, o bien recambiarse rápidamente cuando las células se desplazan. Durante la migración celular, la formación de nuevos complejos focales en el extremo de avance de la célula resulta en la pérdida de tensión en las adhesiones focales previas, lo que provoca la inactivación de la integrina unida a la matriz extracelular.

De manera similar a las células vegetales, que modifican sus paredes celulares para crecer, las células animales modifican la matriz extracelular conforme crecen y migran. Las células secretan varios tipos de enzimas que digieren los glicosaminoglicanos, además de una gran familia de proteasas. Una de las primeras proteasas identificadas fue una enzima que digería colágeno (colagenasa), descubierta en 1962 por el grupo de Jerome Gross y Charles Lapiere en colas de renacuajos de rana en fase de metamorfosis. Esta enzima se convirtió en el primer componente de lo que después sería la familia de metaloproteasas de matriz, que integra a 23 proteasas diferentes en el ser humano. Estas enzimas se ocupan de degradar diversas proteínas de matriz, como colágenos y laminina, además de receptores de superficie celular y moléculas de adhesión. Las metaloproteasas no solo son importantes en los desplazamientos normales de las células durante el desarrollo, sino también en el crecimiento y las metástasis del cáncer.

Interacciones célula-célula

Las interacciones directas entre las células, al igual que entre las células y la matriz extracelular, son críticas para el desarrollo y para la función de los organismos pluricelulares. Algunas interacciones célula-célula son transitorias, como las interacciones entre las células del sistema inmunitario y las interacciones que dirigen a los glóbulos blancos sanguíneos a los lugares de inflamación tisular. En otros casos, las uniones estables célula-célula desempeñan un papel clave en la organización de las células en los tejidos. Por ejemplo, varios tipos diferentes de uniones estables célula-célula son críticas para el mantenimiento y la función de las láminas de células epiteliales. Además de mediar la adhesión celular, tipos especializados de unión proporcionan mecanismos para la rápida comunicación entre células. Las células vegetales también se asocian con las células vecinas no sólo mediante

TABLA 15.2 Moléculas de adhesión celular

Familia	Ligandos reconocidos	Uniones celulares estables
Selectinas	Carbohidratos	No
Integrinas	Matriz extracelular	Adhesiones focales y hemidesmosomas
	Miembros de la superfamilia Ig	No
Superfamilia de Ig	Integrinas	No
	Otras proteínas de la superfamilia Ig	No
Cadherinas	Otras cadherinas	Uniones adherentes y desmosomas

interacciones entre sus paredes celulares, sino también mediante uniones especializadas entre sus membranas plasmáticas.

Uniones adhesivas

La adhesión célula-célula es un proceso selectivo, de tal forma que las células se adhieren solamente a otros tipos específicos de células. Esta selectividad se demostró por primera vez en estudios clásicos de desarrollo embrionario, que mostraban que las células de un tejido (p. ej., el hígado) se adhieren específicamente a células del mismo tejido antes que a células de un tejido diferente (p. ej., cerebro). Esta adhesión célula-célula selectiva viene mediada por proteínas transmembrana denominadas **moléculas de adhesión celular**, que pueden dividirse en cuatro grupos principales: las **selectinas**, las **integrinas**, la **superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)** (llamadas así debido a que contienen dominios estructurales similares a las inmunoglobulinas), y las **cadherinas** (**Tabla 15.2**). Las adhesiones celulares mediadas por selectinas, integrinas y la mayoría de las cadherinas requieren Ca^{2+}, Mg^{2+} o Mn^{2+}, de modo que muchas de las interacciones adhesivas entre células son dependientes de cationes divalentes.

Las selectinas median interacciones transitorias entre los leucocitos y las células endoteliales o las plaquetas sanguíneas. Existen tres miembros de la familia de las selectinas: L-selectina, que se expresa en los leucocitos; E-selectina, que se expresa en las células endoteliales; y P-selectina, que se expresa en las plaquetas. Las selectinas reconocen a los carbohidratos de la superficie celular (**Fig. 15.24**). Uno de sus papeles clave es iniciar las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales durante la migración de los leucocitos desde la circulación a los lugares de inflamación tisular. Las selectinas median la adhesión inicial de los leucocitos a las células endoteliales. Tras esto se forman adhesiones más estables, en las que las integrinas de la superficie de los leucocitos se unen a moléculas de adhesión intracelular (ICAM), que son miembros de la superfamilia de las Ig que se

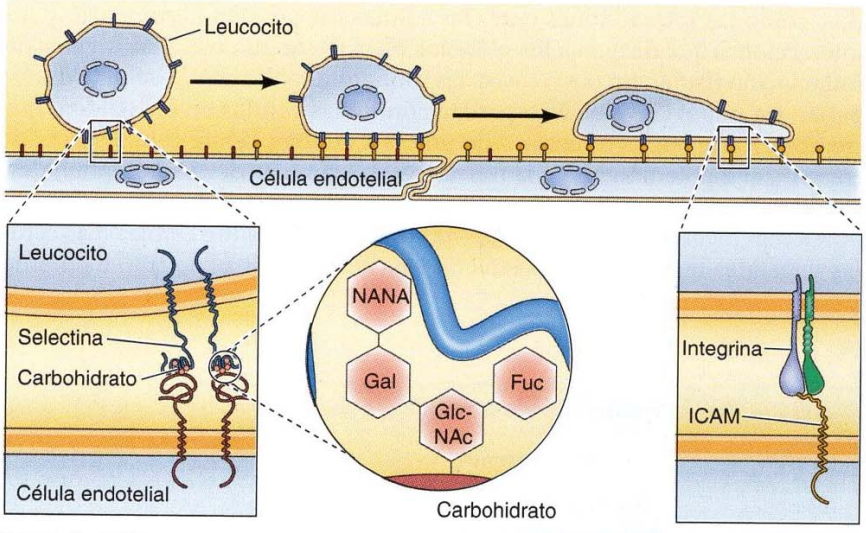


FIGURA 15.24 Adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales. Los leucocitos abandonan la circulación en los lugares de inflamación tisular interaccionando con las células endoteliales de las paredes de los capilares. El primer paso en esta interacción es la unión de las selectinas leucocitarias a los ligandos de carbohidrato (ligandos oligosacáridos) de la superficie de la célula endotelial. Los oligosacáridos contienen *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc), galactosa (Gal) y ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico, NANA). A este paso le siguen interacciones más estables entre las integrinas y moléculas de adhesión intercelular (ICAM) —pertenecientes a la superfamilia de las Ig— en las células endoteliales.

expresan en la superficie de las células endoteliales. Los leucocitos firmemente sujetos son capaces entonces de penetrar la pared de los capilares y entrar al tejido circundante, migrando entre las células endoteliales.

La unión de las ICAM a las integrinas es un ejemplo de **interacción heterofílica**, en que una molécula de adhesión de la superficie de una célula (p. ej., una ICAM) reconoce una molécula diferente de la superficie de otra célula (p. ej., una integrina). Otros miembros de la superfamilia de las Ig median **interacciones homofílicas**, en las que una molécula de adhesión de la superficie de una célula se une a la misma molécula de la superficie de otra célula. Esta unión homofílica conduce a una adhesión selectiva entre células del mismo tipo. Por ejemplo, las moléculas de adhesión de células nerviosas (*N*-CAM) son miembros de la superfamilia de las Ig que se expresan en las células nerviosas, y la unión homofílica entre *N*-CAM contribuye a formar asociaciones selectivas entre las células nerviosas durante el desarrollo. Existen más de cien miembros de la superfamilia de las Ig, los cuales median diversas interacciones célula-célula.

La cuarta clase de moléculas de adhesión celular son las cadherinas. Las cadherinas están implicadas en la adhesión selectiva entre células embrionarias, la formación de sinapsis específicas en el sistema nervioso, y son las proteínas principalmente responsables del mantenimiento de las uniones estables entre células en los tejidos. Las cadherinas son una gran familia de proteínas (más de 100 miembros) que comparten un dominio extracelular altamente conservado que median interacciones principalmente hemofílicas. Por ejemplo, la E-cadherina se expresa en la superficie de células epiteliales de modo que las interacciones hemofílicas entre E-cadherinas da lugar a la adhesión selectiva entre células epiteliales. Debe mencionarse que la pérdida de E-cadherina puede contribuir al desarrollo de cánceres que surgen de tejidos epiteliales, ilustrando la importancia de las interacciones célula-célula en el control del comportamiento celular. Diferentes miembros de la familia de las cadherinas, como la N-cadherina (cadherina neural) y la P-cadherina (cadherina placentaria), median la adhesión selectiva a otros tipos celulares. Hay diversas subfamilias de cadherinas (cadherinas clásicas, cadherinas desmosómicas y protocadherinas) que difieren principalmente en sus dominios transmembrana y citosólicos.

VÍDEO 15.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v15.3

Cadherinas. Las cadherinas son proteínas transmembrana esenciales para la adhesión entre células y dependen de la intervención de los iones calcio.

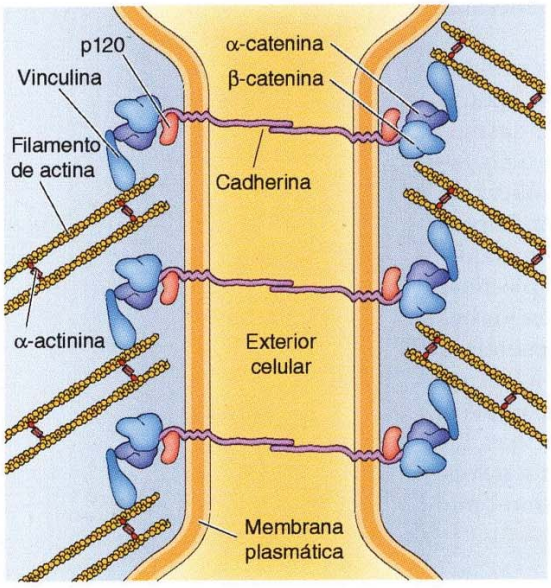


FIGURA 15.25 Uniones adherentes. En las uniones adherentes, las cadherinas se unen a filamentos de actina (citoesqueleto) de una célula a los filamentos de actina de otra. Las cadherinas clásicas transmembrana se unen a la β-catenina y la p120 regulando la actividad de la unión. Además, la β-catenina se une a la α-catenina, que asociaría a los filamentos de actina con las uniones adherentes por la interacción con la vinculina.

Las interacciones célula-célula mediadas por selectinas, integrinas y la mayoría de los miembros de la superfamilia de las Ig son generalmente temporales, si bien las proteínas de la superfamilia de las Ig (como N-CAM) intervienen en la creación de uniones estables en las sinapsis neuronales. No obstante, las uniones de adhesión estable entre el citoesqueleto de células adyacentes suelen basarse en las cadherinas. Como se analizó en el Capítulo 13, estas uniones célula-célula son de dos tipos: **uniones adherentes** y **desmosomas**. En estas uniones, las cadherinas clásicas y desmosómicas están unidas a los paquetes de actina y filamentos intermedios, respectivamente, mediante al interacción de sus colas citosólicas con la β-catenina o con la desmoplaquina. El papel de las cadherinas en asociar los citoesqueletos de células adyacentes es, por tanto, análogo al de las integrinas en formar uniones estables entre células y la matriz extracelular.

La unidad estructural básica de una unión adherente se compone de β-catenina, p120 y α-catenina, además de las cadherinas clásicas transmembrana (**Fig. 15.25**). La β-catenina y la p120 pertenecen a la **familia de las proteínas armadillo** (que reciben su nombre de la proteína β-catenina de *Drosophila*). Se

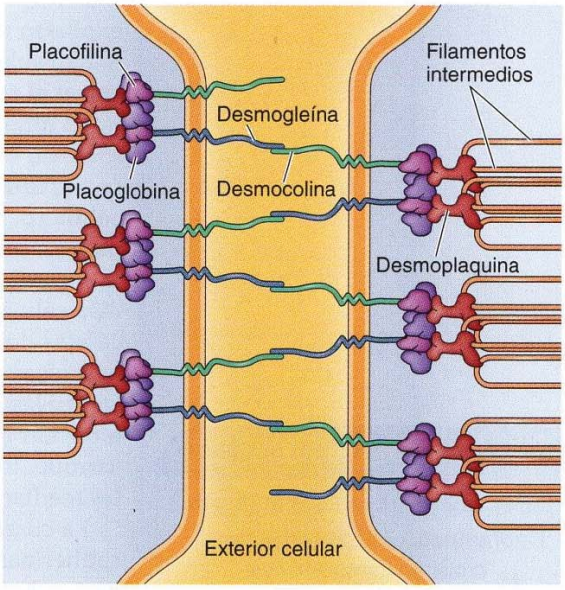


FIGURA 15.26 Desmosomas. En los desmosomas, las cadherinas desmosómicas (desmogleína y desmocolina) se asocian con los filamentos intermedios. Las proteínas de la familia armadillo placoglobina y placofilina se unen a las colas citosólicas de las cadherinas. También se unen a la desmoplaquina, que se une a los filamentos intermedios.

unen a la cola citosólica de las cadherinas para mantener la estabilidad de las uniones. Por otra parte, la β-catenina se une a la α-catenina (a pesar de su nombre, la α-catenina no forma parte de la familia de las proteínas armadillo). La α-catenina se une a la vinculina que, a su vez, se une con la actina, con lo que enlazan las uniones adherentes con el citoesqueleto de actina. Las cateninas actúan así para unir el citoesqueleto de actina de una célula, a través de cadherinas transmembrana, con el citoesqueleto de actina de una célula adyacente.

Además de las cadherinas, un segundo tipo de molécula de adhesión celular, la **nectina**, también se encuentra presente en las uniones adherentes. Existen cuatro nectinas conocidas y una familia de proteínas semejantes a la nectina, que son miembros de la superfamilia de las Ig. Al igual que las cadherinas, las nectinas interaccionan de forma homofílica. Sin embargo, las nectinas también pueden unirse heterofílicamente a diferentes nectinas de la membrana de la célula opuesta. Esta unión heterofílica de las nectinas puede mediar en las asociaciones entre diferentes tipos de células, por ejemplo, entre neuronas y células gliales en el encéfalo. Al igual que las cadherinas, las nectinas forman enlaces con el citoesqueleto de actina. Además de constituir uniones celulares heterotípicas, a menudo las nectinas inician uniones celulares homotípicas, que reclutan cadherinas en los puntos de adhesión.

A diferencia de las uniones adherentes, los desmosomas asocian directamente los citoesqueletos de filamentos intermedios (en lugar de la actina) de células adyacentes (**Fig. 15.26**). Las cadherinas desmosomales, **desmogleína** y **desmocolina**, se unen a través de la unión. Las proteínas de la familia armadillo placoglobina y placofilina se unen a las colas citosólicas de las cadherinas desmosomales y proporcionan un enlace directo con la proteína de unión a filamentos intermedios, desmoplaquina. La desmoplaquina es un miembro de la familia plaquina y está relacionada con la plectina, que funciona análogamente para unir los filamentos intermedios en los hemidesmosomas (véase Fig. 15.22). La fuerza de las uniones desmosómicas entre células es una propiedad tanto de los filamentos intermedios a los que se unen como a las múltiples interacciones entre placoglobina, placofilina y desmoplaquina que unen los filamentos intermedios a las cadherinas. La variación tisular de las características de los desmosomas se logra a través de la existencia de numerosos genes que codifican cadherinas desmosómicas y proteínas de la familia de armadillo.

Uniones estrechas

Las **uniones estrechas** son críticamente importantes para la función de las láminas de células epiteliales como barrera entre compartimentos fluidos. Por ejemplo, el epitelio intestinal separa la luz del intestino del tejido conectivo subyacente, que contiene capilares sanguíneos. Las uniones estrechas juegan dos papeles para permitir que los epitelios cumplan con dichas funciones de barrera. En primer lugar, las uniones estrechas forman sellos que previenen el paso libre de moléculas (incluyendo los iones) entre las células de las láminas epiteliales. En segundo lugar, las uniones estrechas separan

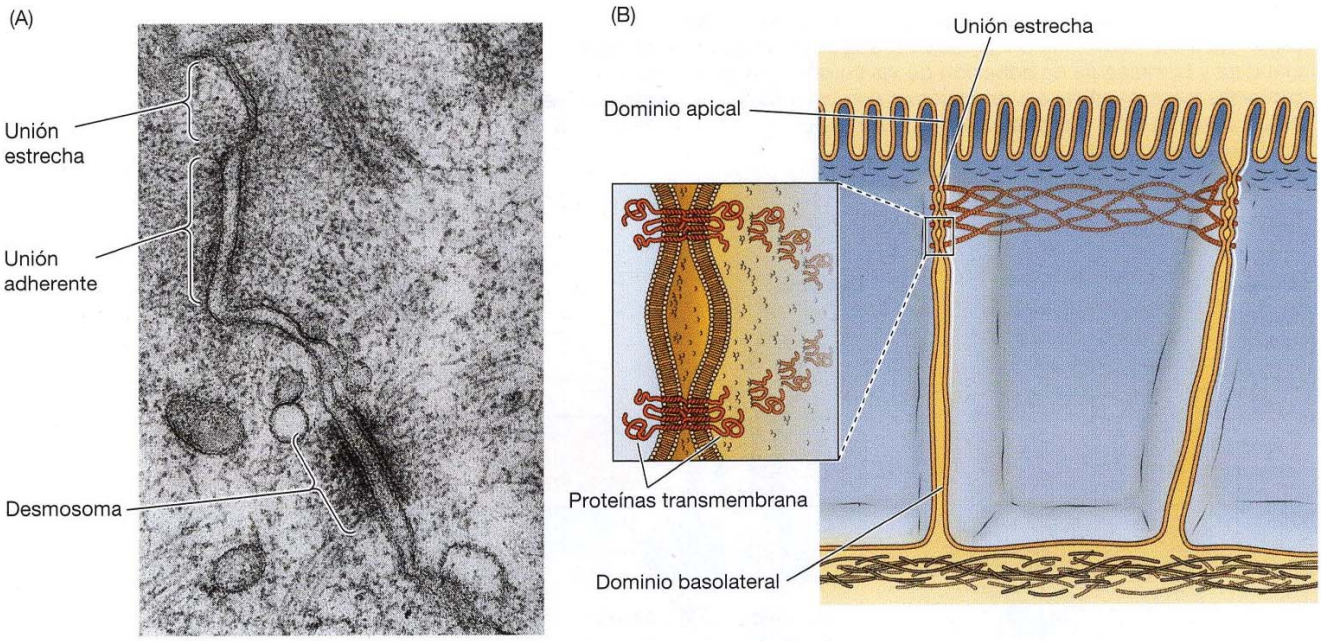


FIGURA 15.27 Uniones estrechas. (A) Micrografía electrónica de células epiteliales unidas por un complejo de unión, que incluye una unión estrecha, una unión adherente y un desmosoma. (B) Las uniones estrechas se forman por interacciones entre hebras de proteínas transmembrana de las células adyacentes.

◆ **Las capas de células epiteliales constituyen barreras significativas frente a los microorganismos invasores. Las bacterias patogénicas han desarrollado estrategias que alteran los complejos de unión, permitiéndoles penetrar entre las células de las láminas epiteliales.**

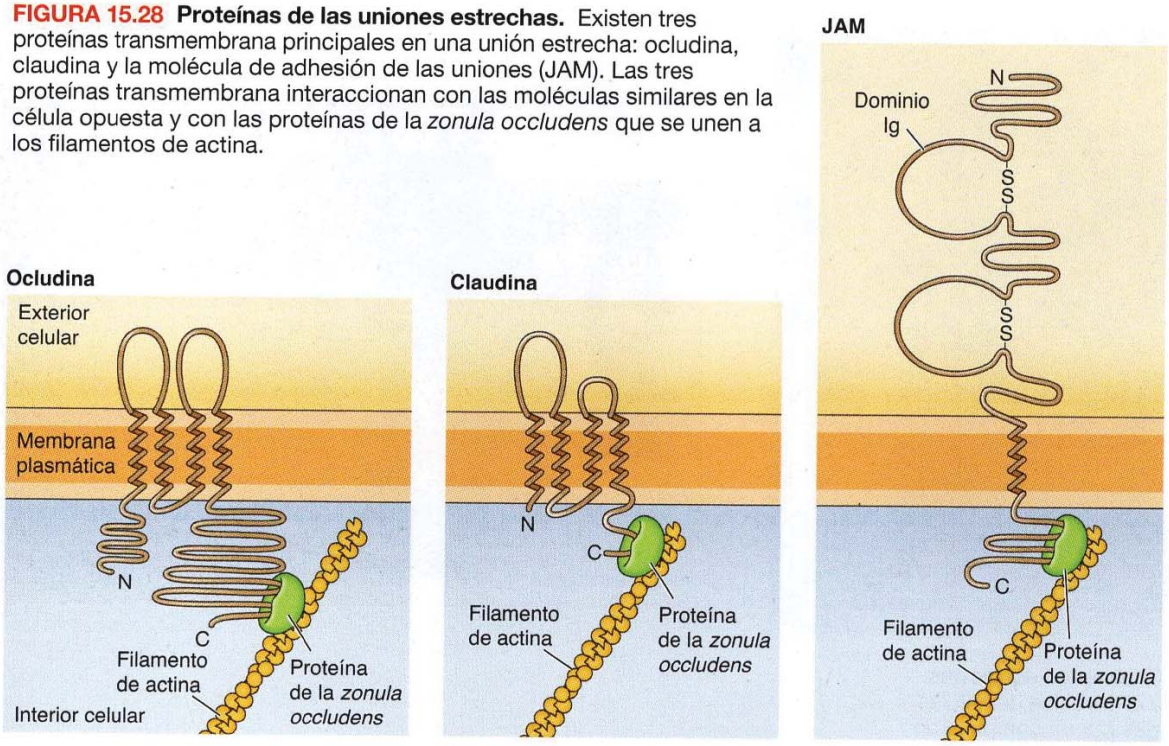
los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, impidiendo la libre difusión de lípidos y proteínas de membrana entre ellos. Como consecuencia, existen sistemas de transporte especializados en los dominios apical y basolateral capaces de controlar el tráfico de moléculas entre los distintos compartimentos extracelulares, como el transporte de glucosa entre la luz intestinal y el suministro sanguíneo (véase Fig. 14.32). Mientras que las uniones estrechas son sellos muy efectivos del espacio extracelular, proporcionan una mínima fuerza adhesiva entre células opuestas, de modo que generalmente se asocian con uniones adherentes y desmosomas para formar un **complejo de unión** (**Fig. 15.27**).

Las uniones estrechas son los contactos más estrechos conocidos entre células adyacentes. Originalmente fueron descritos como sitios de aparente fusión entre las caras externas de las membranas plasmáticas, aunque actualmente está claro que las membranas no se fusionan. Por el contrario, las uniones estrechas están formadas por una red de hebras proteicas que continúan a lo largo de toda la circunferencia celular (véase Fig. 15.27B). Cada hebra de estas redes está compuesta por proteínas transmembrana de la ocludina, la claudina, y de moléculas de adhesión de las uniones (JAM: *junctional adhesion molecules*) (**Fig. 15.28**). Estas tres proteínas se unen a proteínas similares en células adyacentes, sellando así el espacio entre las membranas plasmáticas. Las colas citosólicas de las ocludinas, las claudinas y JAM también se asocian con proteínas de la familia de la *zonula occludens*, que asocian el complejo de unión estrecha con el citoesqueleto de actina y mantienen a la unión estrecha en su localización en la membrana plasmática.

Uniones de tipo gap

Las actividades de células individuales en los organismos multicelulares deben estar estrechamente coordinadas. Esto puede conseguirse mediante moléculas señalizadoras que son liberadas por una célula y actúan sobre otra, como se analiza en el Capítulo 16. Sin embargo, en un tejido individual, como el hígado, las células a menudo se encuentran unidas mediante

FIGURA 15.28 Proteínas de las uniones estrechas. Existen tres proteínas transmembrana principales en una unión estrecha: ocludina, claudina y la molécula de adhesión de las uniones (JAM). Las tres proteínas transmembrana interaccionan con las moléculas similares en la célula opuesta y con las proteínas de la *zonula occludens* que se unen a los filamentos de actina.



uniones de tipo *gap*, que proporcionan conexiones directamente entre los citoplasmas de células adyacentes. Las uniones intercelulares comunicantes son canales regulados que atraviesan la membrana plasmática que, cuando están abiertos, permiten la difusión de iones y moléculas de pequeño tamaño (menos de unos 1.000 daltons) a través de células próximas. Como consecuencia, las uniones *gap* acoplan tanto las actividades metabólicas como las respuestas eléctricas de las células que conectan. La mayoría de las células en los tejidos animales —incluyendo células epiteliales, células endoteliales y las células del músculo cardíaco y liso— se comunican mediante uniones *gap*. En células eléctricamente excitables, como las células del músculo cardíaco, el paso directo de iones a través de uniones *gap* acopla y sincroniza las contracciones de las células vecinas. Las uniones *gap* también permiten el paso de algunas moléculas de señalización intracelular, como el AMPc y el Ca^{2+}, entre células adyacentes, potencialmente coordinando las respuestas celulares en los tejidos.

Las uniones de tipo *gap* están construidas sobre proteínas transmembrana de la familia **conexina**, que consiste en al menos 21 proteínas humanas diferentes. Seis conexinas se ensamblan para formar un cilindro con un poro acuoso abierto en su centro (**Fig. 15.29**). Este ensamblaje de conexinas, conocido como **conexón**, en la membrana plasmática de una célula se alinea con un conexón de una célula adyacente, formando un canal abierto entre ambos citoplasmas. Las membranas plasmáticas de ambas células están separadas por un espacio que corresponde al espacio ocupado por los domi-

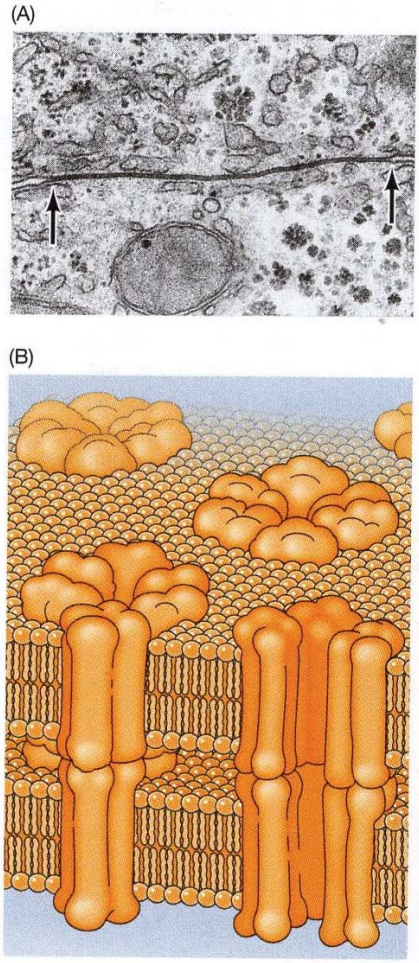
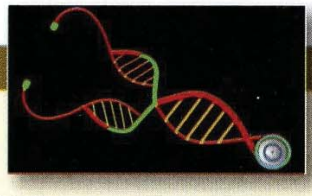


FIGURA 15.29 Uniones de tipo *gap*. (A) Micrografía electrónica de una unión de tipo *gap (flechas)* entre dos células hepáticas. (B) Las uniones de tipo *gap* están constituidas por ensamblajes de seis conexinas (llamados conexones) que forman canales abiertos a través de las membranas plasmáticas de las células adyacentes.



MEDICINA MOLECULAR

Enfermedades por las uniones de tipo *gap*

Enfermedades

Se ha descubierto que diversas patologías humanas sin relación entre sí son el resultado de mutaciones de genes que codifican proteínas conexina de las uniones de tipo *gap*. La primera de estas patologías que se describió es la forma ligada al cromosoma X de la patología de Charcot-Marie-Tooth (CMT), que se mapeó a mutaciones en el gen que codificaba la conexina 32 en 1993. El CMT es una patología hereditaria que da lugar a la degeneración progresiva de los nervios periféricos, con una lenta pérdida del control muscular y finalmente degeneración muscular. Se conocen más de 200 mutaciones distintas del gen de la conexina 32 que se vinculan con el CMT. El CMT también puede estar causado por varios genes diferentes que codifican proteínas de mielina, defectos que desencadenan directamente en la degeneración de los nervios mielínicos. Adicionalmente, una forma de CMT ha sido mapeada a una mutación en el gen de la lámina nuclear A (véase Cap. 10, Medicina Nuclear, Patologías de la Lámina Nuclear).

El descubrimiento de que el CMT podría estar causado por mutaciones en una conexina, implicaba que las uniones de tipo *gap* jugaban un papel crítico en los nervios mielinizados. Adicionalmente, el CMT sólo era la primera de varias patologías hereditarias que ahora se han relacionado con mutaciones en genes que codifican conexinas. Las consecuencias patológicas más comunes de las mutaciones en conexinas son las cataratas, trastornos de la piel y la sordera.

Bases moleculares y celulares

El genoma humano contiene 21 genes que codifican distintas conexinas (genes *Cx*), que están divididas en tres subfamilias (α, β y γ). Mutaciones en ocho de estos genes han sido identificadas como causantes de patologías humanas (véase Tabla). Por ejemplo, las mutaciones de *Cx32/β1* están asociadas con la patología de Charcot-Marie-Tooth y con la sordera. Las proteínas de la familia conexinas poseen una expresión de amplia distribución; *Cx32/β1* se expresa en los nervios periféricos, hígado y tejido cerebral, y *Cx43α1* (también asociado con la sordera) se expresa en más de 35 tejidos humanos diferentes. Así, resulta sorprendente que hay menos de 10 tipos diferentes de tipos de patologías humanas conocidas cuya causa son mutaciones de las conexinas. Puesto que muchos tejidos expresan diversas proteínas conexinas diferentes, la simple explicación de ausencia de un defecto en muchos tejidos resultante de la pérdida de una sola conexina, es que otras conexinas compensan la función de la que está ausente. La cuestión es, por tanto, por qué una sola mutación cualquiera en un solo gen de conexina causa una patología humana.

El descubrimiento inicial de mutaciones de *Cx32/β1* en CMT estaba basado en ocho mutaciones diferentes en varias familias: seis cambios de una sola base que resultaban en sustituciones no conservativas de los aminoácidos, un cambio del marco de lectura que generaba una proteína más corta, y una mutación en la región promotora del gen. Estas ocho mutaciones en *Cx32/β1*, además de otras 262 que han sido descubiertas posteriormente, causan un CMT clínicamente idéntico, sugiriendo que los nervios mielinizados pueden ser un tejido especialmente sensible a defectos en las uniones tipo *gap*. Otros tres tejidos también parecen ser sensibles a mutaciones en las conexinas: la lente del ojo, el epitelio sensorial del oído interno y la piel. La sensibilidad de la lente es más fácil de comprender, porque las células fibrosas de la lente pierden la mayoría de sus orgánulos durante el desarrollo y se llenan de una proteína cristalina para permitir el paso de la luz. Deben obtener nutrientes e iones de las células epiteliales de la lente a través de las uniones *gap*, y la pérdida de este aporte da lugar a la formación de cataratas. La sensibilidad del epitelio sensorial del oído interno está relacionada con la necesidad de las células epiteliales de intercambiar K^+ rápidamente a través de la comunicación de las uniones *gap*. La base del crecimiento excesivo de las capas externas de la piel está menos clara, pero se cree que las uniones *gap* juegan un papel en el equilibrio entre proliferación y diferenciación, y mutaciones en las uniones *gap* alteran este equilibrio.

Cada uno de estos tejidos expresa conexinas adicionales, y su incapacidad para compensar la pérdida de la conexina mutante parece estar basada en dos fenómenos. A pesar de que las uniones de tipo *gap* pueden formarse por combinaciones de diferentes conexinas, no todas las conexinas son capaces de cooperar para formar conexones funcionales. Así, las conexinas de los tejidos sensibles pueden no ser capaces de compensar de forma eficaz una que está mutada. Adicionalmente, los conexones de las uniones *gap* son ensamblados no en la superficie celular, sino en el aparato de Golgi o antes en el proceso secretor. Así, una sola conexina mutante que no puede ser procesada y exportada

Mutaciones por las uniones de tipo *gap* en patologías humanas

Enfermedad	Proteína conexina
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	Cx32/β1
Sordera	Cx26/β2, Cx30/β6, Cx31/β3, Cx32/β1, Cx43α1
Enfermedades de la piel	
Eritroqueratodermia variable	Cx31/β3, Cx30,3/β4
Síndrome de Vohwinkel	Cx26/β2
Cataratas	Cx46/α3, Cx50α8

Las proteínas Cx se nombran por el peso molecular o por la pertenencia a una subfamilia.

MEDICINA MOLECULAR

adecuadamente puede actuar como un dominante negativo e interferir con el procesamiento de las conexinas normales expresadas en ese tejido. Esto ha sido descrito recientemente en un mutante de *Cx46*/α3 que causa cataratas congénitas: la proteína mutante no es capaz de salir del CIREG (compartimento intermedio RE-Golgi) o complejo del Golgi, y retiene a las conexinas normales. Parece ser, por tanto, que la relación de determinados trastornos con mutaciones en las conexinas puede resultar de las necesidades de las uniones *gap* de un tejido determinado, además de la naturaleza de las interacciones entre conexinas que son expresadas en dicho tejido.

Prevención y tratamiento

La identificación de diversas patologías humanas causadas por mutaciones en los genes de conexina ilustra la importancia de las uniones de tipo *gap* en la función tisular normal. Al igual que otras uniones críticas para la estructura tisular o la función, las uniones *gap* parecerían ser localizaciones obvias para patologías hereditarias humanas; sin embargo, dichas patologías son poco frecuentes. Descubrimientos recientes sobre el procesamiento y ensamblaje de los conexones de las uniones de tipo *gap* han empezado a explicar las bases de estas patologías infrecuentes. Mientras que se cree que todos los genes de conexinas humanas han sido descritos, la distribución tisular de las proteínas —especialmente durante el desarrollo embrionario— sigue siendo poco conocido. Nuevos conocimientos sobre la distribución e interacciones de las proteínas de la familia conexina proporcionará una base para la comprensión de cada una de las patologías resultantes de mutaciones en los genes que codifican conexinas. Sólo entonces podrán desarrollarse posibles terapias compensatorias —por ejemplo, regulando la proliferación celular en la piel o el intercambio de K^+ en el oído interno.

Referencias

Pfenniger, A., A. Wohlwend y B. R. Kwak. 2011. Mutation in connexin genes and disease. *Eur. J. Clin. Invest* 41: 103–116.

nios extracelulares de las conexinas —de ahí su nombre «*gap junction*», *gap* significa hueco en inglés, que fue acuñado por los microscopistas electrónicos—. Muchas células expresan más de un miembro de la familia conexina, y combinaciones de diferentes conexinas puede dar lugar a uniones de tipo *gap* con propiedades diversas.

Los ensamblajes especializados de uniones *gap* pueden tener lugar en células nerviosas específicas y forman una **sinapsis eléctrica**. Los conexones individuales en el interior de la sinapsis eléctrica pueden abrirse o cerrarse en respuesta a diversos tipos de señales pero, una vez abiertos, permiten el paso rápido de iones entre dos células nerviosas. La importancia de las uniones *gap* —especialmente en el sistema nervioso— está ilustrado por el número de patologías humanas asociadas con mutaciones en los conexones.

Plasmodesmas

La adhesión entre las células vegetales tiene lugar a través de sus paredes celulares en vez de mediante proteínas transmembrana. En particular, una región especializada rica en pectina de la pared celular llamada la **lámina media** actúa como un pegamento que mantiene unidas las células adyacentes. Debido a la rigidez de las paredes celulares vegetales, las asociaciones

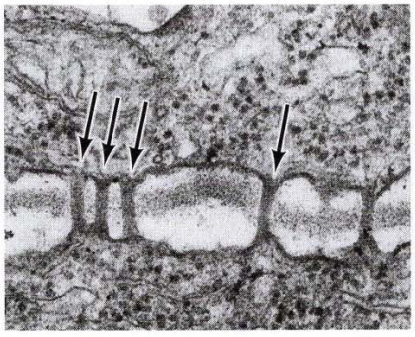


FIGURA 15.30 Plasmodesmas. Micrografía electrónica de plasmodesmas *(flechas)*.

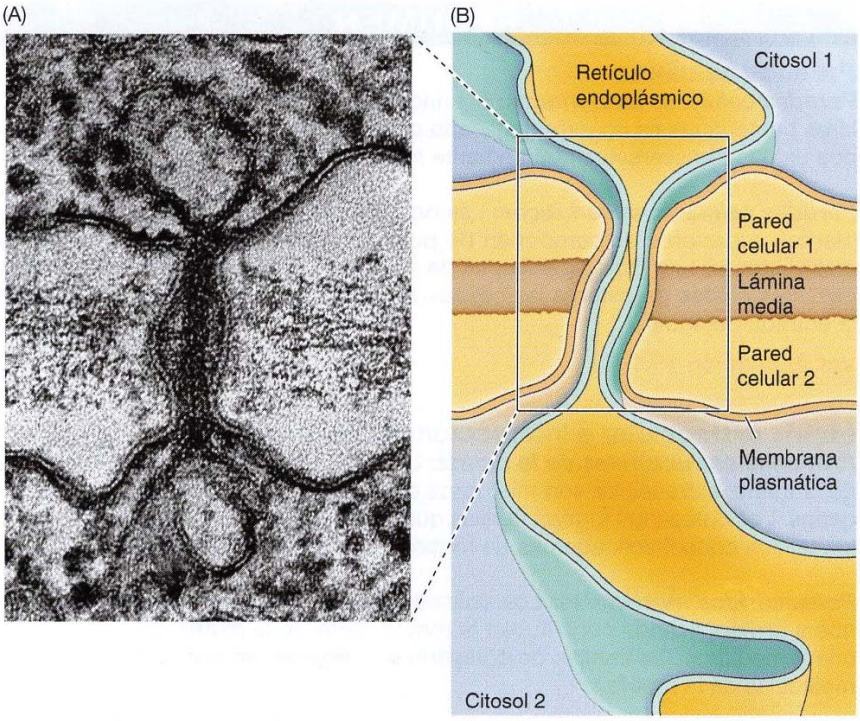


FIGURA 15.31 Estructura de los plasmodesmas. En un plasmodesma, las membranas plasmáticas de las células vecinas son continuas, formando canales citoplásmicos a través de las paredes celulares adyacentes. Una extensión del retículo endoplásmico generalmente pasa a través del canal. (A, De Tilney, L. y cols., 1991. *J. Cell Biol.* 112: 739-748.)

estables entre las células vegetales no requieren la formación de puentes citoesqueléticos, como aquellos proporcionados por los desmosomas y las uniones adherentes de las células animales. Sin embargo, las células vegetales adyacentes se comunican entre sí mediante conexiones citoplasmáticas llamadas **plasmodesmas** (**Fig. 15.30**). A pesar de ser diferentes en su estructura los plasmodesmas funcionan de forma análoga a las uniones *gap* como un medio de comunicación directa entre células adyacentes en el interior de los tejidos. Además, los plasmodesmas tienen un papel importante en la señalización en plantas al permitir que las moléculas reguladoras, como los factores de transcripción y los ARNmi, se desplacen directamente entre las células.

Los plasmodesmas pueden formarse a partir de la separación incompleta de células hijas después de una mitosis vegetal. Por otra parte, pueden formarse nuevos plasmodesmas entre células adyacentes. En cada plasmodesma la membrana plasmática de una célula es continua con la de su vecina, creando un canal abierto entre los dos citosoles (**Fig. 15.31**). Una extensión del retículo endoplasmático liso pasa a través del poro, dejando un anillo de citoplasma circundante a través del cual los iones y las moléculas pequeñas son capaces de pasar libremente entre las células. Los plasmodesmas son estructuras dinámicas que pueden abrirse o cerrarse en respuesta a los estímulos apropiados, permitiendo el paso regulado de macromoléculas entre células adyacentes. Además, los plasmodesmas pueden expandirse en respuesta a un estímulo apropiado, permitiendo el tránsito regulado de macromoléculas entre las células adyacentes. De esta manera, los plasmodesmas desempeñan un papel clave en señalización celular y el desarrollo vegetal mediante el control del tráfico de moléculas reguladoras, como los factores de transcripción y los ARN reguladores, entre las células.

RESUMEN

Paredes celulares

Paredes celulares bacterianas: El principal componente de las paredes celulares bacterianas es un peptidoglicano constituido por cadenas de polisacáridos unidas transversalmente mediante péptidos cortos.

peptidoglicano

Paredes celulares eucarióticas: Las paredes celulares de los hongos, algas y plantas superiores se componen de polisacáridos fibrosos (p. ej., celulosa) embebidos en una matriz gelatinosa de polisacáridos y proteínas. Sus paredes celulares rígidas permiten a las células vegetales expandirse rápidamente por la entrada de agua.

quitina, celulosa, hemicelulosa, pectina, pared celular primaria, pared celular secundaria, lignina, presión de turgencia, auxina, celulosa sintetasa

Ver Animación 15.1

Matriz extracelular e interacciones célula-matriz

Proteínas estructurales de la matriz: Las principales proteínas estructurales de la matriz extracelular son miembros de la gran familia proteica de los colágenos. Los colágenos forman fibrillas que caracterizan la matriz extracelular de los tejidos conectivos, además de formar redes en la lámina basal.

matriz extracelular, lámina basal, colágeno, fibrilla de colágeno, procolágeno, fibra elástica, elastina

Polisacáridos matriciales: Los polisacáridos en forma de glicosaminoglicanos y proteoglicanos constituyen la mayor parte de la matriz extracelular. Se une y modifican las fibrillas de colágeno e interaccionan con todo el resto de moléculas de la matriz.

glicosaminoglicano (GAG), proteoglicano

Proteínas de adhesión de la matriz: Las proteínas de unión a la matriz asocian a los componentes de la matriz extracelular entre sí y son los principales sitios de unión para las integrinas, que median la mayoría de las adhesiones célula-matriz.

fibronectina, laminina, nidógeno

Interacciones célula-matriz: Las integrinas son los principales receptores de la superficie celular que unen las células a la matriz extracelular. En las adhesiones focales y en los hemidesmosomas, las integrinas proporcionan enlaces estables entre la matriz extracelular y los citoesqueletos de actina y de filamentos intermedios, respectivamente.

integrina, adhesión focal, hemidesmosoma

Ver Vídeos 15.1 y 15.2

Interacciones célula-célula

Uniones adhesivas: Las interacciones selectivas intercelulares están mediadas por cuatro grupos principales de proteínas de adhesión celular: selectinas, integrinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y cadherinas. Las cadherinas unen los citoesqueletos de las células adyacentes en las uniones célula-célula estables.

molécula de adhesión celular, selectina, superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), cadherina, interacción heterofílica, interacción homofílica, unión adherente, desmosoma, armadillo, nectina, desmogleína, desmosolina

Ver Vídeo 15.3

Uniones estrechas: Las uniones estrechas impiden el libre tránsito de las moléculas entre las células epiteliales, y separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática.

unión estrecha, complejo de unión

***Uniones de tipo* gap:** Las uniones de tipo *gap* son canales abiertos que conectan los citoplasmas de las células adyacentes. Las sinapsis eléctricas son uniones de tipo *gap* que median la señalización entre células del sistema nervioso.

unión de tipo *gap*, conexina, conexón, sinapsis eléctrica

Plasmodesmas: Las células vegetales adyacentes se unen a través de conexiones citoplasmáticas denominadas plasmodesmas.

lámina media, plasmodesma

Preguntas

1. ¿En qué difieren las paredes celulares y sus membranas adyacentes entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas?
2. ¿Cómo determinan las proteínas citoesqueléticas bacterianas la forma de la célula?
3. Una función importante de la bomba de Na^+-K^+ en las células animales es mantener el equilibrio osmótico. ¿Por qué esto no es necesario en las células vegetales?
4. ¿Cómo imparten fuerza estructural las hemicelulosas a las paredes celulares vegetales?
5. ¿Cuál es la importancia de dirigir selectivamente los diferentes transportadores de glucosa a los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de las células epiteliales intestinales? ¿Cuál es el papel de las uniones estrechas en este proceso?
6. ¿Cómo afectaría un inhibidor de la enzima lisil hidroxilasa (la enzima responsable de hidroxilar residuos de lisina en el colágeno) a la estabilidad del colágeno sintetizado por una célula?
7. ¿Por qué los colágenos formadores de fibrillas no se ensamblan en hélices triples en el interior celular?
8. ¿Qué propiedad de los GAG les permite formar geles hidratados?
9. Estás estudiando un transportador que sólo se encuentra en la membrana plasmática apical de las células epiteliales. Tratas las células epiteliales con un péptido sintético que es similar al dominio extracelular de una proteína de la familia claudina. El transportador ahora se encuentra tanto en el dominio apical como basolateral de la membrana plasmática. ¿Cuál es el mecanismo por el que el péptido altera la localización del transportador?
10. Has sobreexpresado un dominante negativo de E-cadherina que carece de un dominio extracelular en células epiteliales. ¿Cómo afectará esta mutación a la adhesión célula-célula?
11. Una mutación en una célula epitelial da lugar a la expresión de integrina $\alpha_6\beta_4$ con un dominio citoplásmico delecionado. ¿Cómo afectará esta mutación la adhesión de la célula epitelial a la lámina basal?
12. ¿Qué es una sinapsis eléctrica? ¿Para qué función sirve?
13. ¿En qué se parecen las uniones de tipo *gap* y las plasmodesmas? ¿Es probable que sean estructuras análogas u homólogas entre los animales y los vegetales?

Bibliografía

Paredes celulares

Cabeen, M. T. and C. Jacobs-Wagner. 2007. Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell morphogenesis. *J. Cell Biol. 179:* 381–387. [R]

Celler, K., R. L. Koning, A. J. Koster and G. P. van Wezel. 2013. Multidimensional view of the bacterial cytoskeleton. *J. Bacteriol.* 195: 1627–1636. [R]

Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 850–861. [R]

Lerouxel, O., D. M. Cavalier, A. H. Liepman and K. Keegstra. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 621–630. [R]

Merzendorfer, H. 2011. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* 90: 759–769. [R]

Oda, Y. and H. Fukuda. 2012. Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 38–44. [R]

Paredez, A., A. Wright and D. W. Ehrhardt. 2006. Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 571–578. [R]

Pauly, M. and K. Keegstra. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54: 559–568. [R]

Somerville, C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 53–78. [R]

Wasteneys, G. O. and J. C. Ambrose. 2009. Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19: 62–71. [R]

Matriz extracelular e interacciones célula-matriz

Barczyk, M., S. Carracedo and D. Gullberg. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res.* 339: 269–280. [R]

Berrier, A. L. and K. M. Yamada. 2007. Cell–matrix adhesion. *J. Cell Physiol.* 213: 565–573. [R]

Bishop, J. R., M. Schuksz and J. D. Esko. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030–1037. [R]

Bouvard, D., J. Pouwels, N. De Franceschi and J. Ivaska. 2013. Integrin inactivators: balancing cellular functions *in vitro* and *in vivo*. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 430–442. [R]

Calderwood, D. A., I. D. Campbell and D. R. Critchley. 2013. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 503–517. [R]

Durbeej, M. 2010. Laminins. *Cell Tissue Res.* 339: 259–268. [R]

Hynes, R. O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326: 1216–1219. [R]

Lecuit, T. 2005. Adhesion remodeling underlying tissue morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 15: 34–42. [R]

Leitinger, B. 2011. Transmembrane collagen receptors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 25–56. [R]

Moser, M., K. R. Legate, R. Zent and R. Fassler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324: 895–899. [R]

Mouw, J. K., G. Ou and V. M. Weaver. 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 771–785. [R]

Page-McCaw, A., A. J. Ewald and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 221–233. [R]

Rozario, T. and D. W. DeSimone. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* 341, 126–140. [R]

Shattil, S. J., C. Kim and M. H. Ginsberg. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 288–300. [R]

Tamkun, J. W., D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, and R. O. Hynes. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46: 271–282. [P]

Yurchenco, P. D. 2011. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3:a004911. [R]

Interacciones célula-célula

Bergoffen, J., S. S. Scherer, S. Wang, M. O. Scott, L. J. Bone, D. L. Paul, K. Chen, M. W. Lensch, P. F. Chance, and K. H. Fischbeck. 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039–2042. [P]

Elias, L. A., and A. R. Kriegstein. 2008. Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci.* 31: 243–250. [R]

Green, K. J., and C. L. Simpson. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest Dermatol.* 127: 2499–2515. [R]

Harris, T. J. C. and U. Tepass. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Rev. Cell Mol. Biol.* 11: 502–514. [R]

Kragler, F. 2013. Plasmodesmata: intercellular tunnels facilitating transport of macromolecules in plants. *Cell Tissue Res.* 352: 49–58. [R]

Laird, D. W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394: 527–543. [R]

Lee, J. Y., and H. Lu. 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends Plant Sci.* 16: 201–210. [R]

Lucas, W. J., B. K. Ham and J. Y. Kim. 2009. Plasmodesmata - bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* 19: 495–503. [R]

Nekrasova, O. and K. J. Green. 2013. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol.* 23: 537–546. [R]

Niessen, C. M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest Dermatol.* 127: 2525–2532. [R]

Pokutta, S., and W. I. Weis. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell–cell contacts. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 237–261. [R]

Rikitake, Y., K. Mandai and Y. Takai. 2012. The role of nectins in different types of cell–cell adhesion. *J. Cell Sci.* 125: 3713–3722. [R]

Sotomayor, M., R. Gaudet and D. P. Corey. 2014. Sorting out a promiscuous superfamily: towards cadherin connectomics. *Trends Cell Biol.* 24: 524–536. [R]

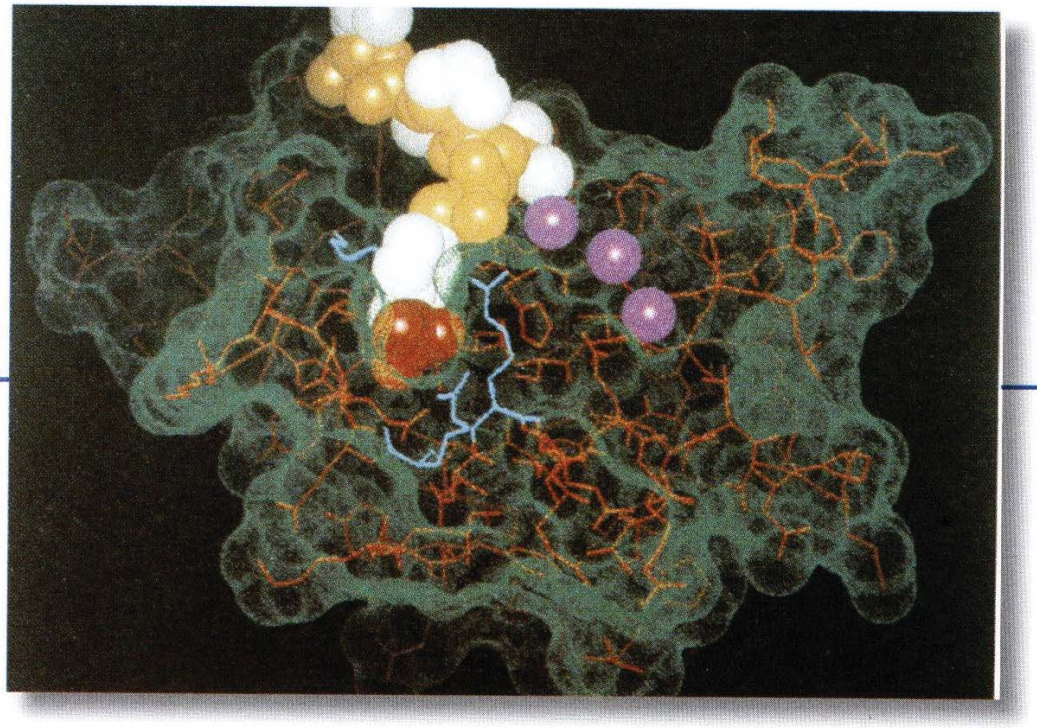
Takeichi, M. 2014. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 397–410. [R]

van Steensel, M. A. 2004. Gap junction diseases of the skin. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 131C: 12–19. [R]

Wei, C. J., X. Xu and C. W. Lo. 2004. Connexins and cell signaling in development and disease. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 811–838. [R]

Parte IV

Regulación celular

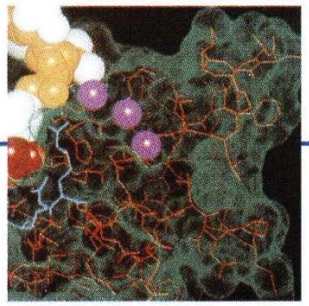


Capítulo 16 **Señalización celular**

Capítulo 17 **Ciclo celular**

Capítulo 18 **Muerte y renovación celular**

Capítulo 19 **Cáncer**



Capítulo 16

Señalización celular

Moléculas señalizadoras y sus receptores 601

Señalización de proteínas G y AMP cíclico 611

Tirosina quinasas y señalización por las vías de las quinasas MAP, las PI 3-quinasas y la fosfolipasa C/calcio 619

Receptores acoplados a factores de transcripción 637

Dinámica y redes de señalización 641

EXPERIMENTO CLAVE:
Receptores acoplados a proteínas G y detección de olores 613

MEDICINA MOLECULAR:
Cáncer: transducción de señales y oncogenes *ras* 625

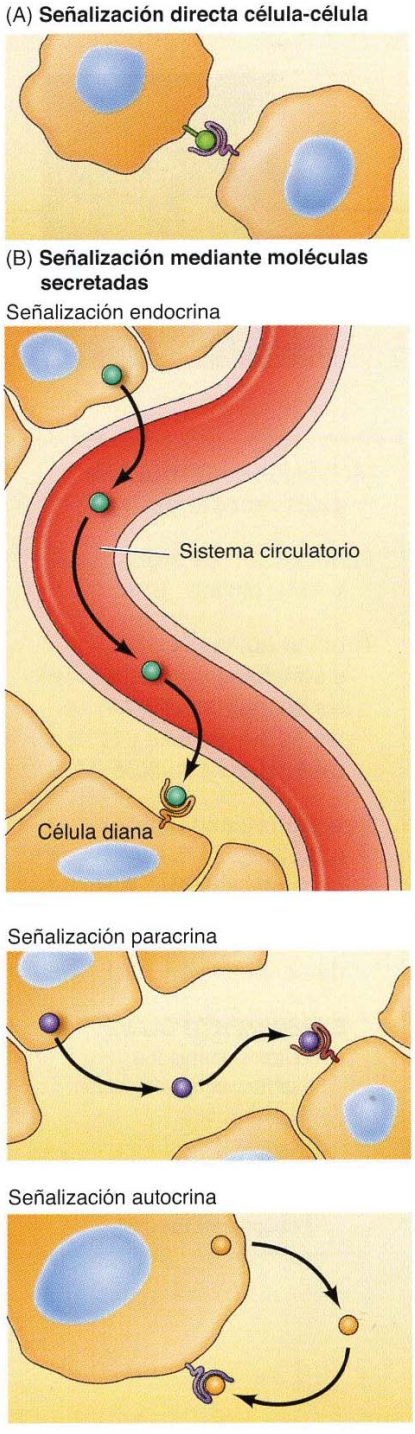
Todas las células reciben señales desde su medio y responden a estas señales. Incluso la bacteria más sencilla capta y se desplaza hacia concentraciones elevadas de nutrientes, como la glucosa o los aminoácidos. Muchas bacterias y eucariotas unicelulares también responden a moléculas señalizadoras secretadas por otras células, permitiendo, de este modo, la comunicación célula-célula. Por ejemplo, el apareamiento entre células de levadura se señaliza mediante péptidos que son secretados por una célula y se unen a receptores en la superficie de la otra. Sin embargo, es en los organismos pluricelulares donde la comunicación célula-célula alcanza su grado más elevado de complejidad. Mientras que las células procariotas y las de los organismos eucariotas unicelulares son, en gran medida, autónomas, el comportamiento de cada célula en las plantas y animales pluricelulares ha de ser regulado cuidadosamente para satisfacer los requerimientos del organismo como un todo. Esto se consigue a través de un amplio repertorio de moléculas señalizadoras que, bien son secretadas, o bien se expresan en la superficie celular, las cuales se unen a receptores expresados en otras células, integrando y coordinando de esta manera las funciones de las distintas células individuales que constituyen organismos tan complejos como el ser humano.

La unión de la mayoría de estas moléculas señalizadoras a sus receptores provoca una cascada de reacciones intracelulares que son las que regulan, en gran medida, los diferentes aspectos del comportamiento celular, incluyendo su metabolismo, la motilidad, la proliferación, su supervivencia y la diferenciación. La comprensión de los mecanismos moleculares que constituyen estas vías de señalización celular se ha convertido, por tanto, en un área prioritaria de investigación. El interés en este campo es aún mayor por el hecho de que muchos tipos de cáncer surgen debido a una alteración en las vías de señalización celular que controlan la proliferación y supervivencia de las células sanas. Por su parte, muchos de nuestros conocimientos acerca de los mecanismos de señalización celular proceden del estudio de células cancerosas, lo que supone un claro ejemplo de la fructífera relación entre la medicina y la investigación básica en la biología molecular y celular.

Moléculas señalizadoras y sus receptores

Son muchos los diferentes tipos de moléculas que transmiten información entre las células de los organismos pluricelulares. Aunque todas ellas actúan como ligandos que se unen a receptores expresados por las células diana, existe una variabilidad considerable en la estructura y función de los distintos tipos de moléculas que actúan como transmisores de señales. En cuanto a su estructura, el rango de complejidad de las moléculas señalizadoras utilizadas por plantas y animales varía desde los gases sencillos hasta las proteínas. Algunas de estas moléculas transmiten las señales a través de largas

FIGURA 16.1 Tipos de señalización célula-célula. La señalización celular puede tener lugar bien (A) mediante contacto directo célula-célula, o bien (B) a través de la acción de moléculas señalizadoras secretadas. En la señalización endocrina, las hormonas se transportan a través del sistema circulatorio y actúan sobre células diana alejadas. En la señalización paracrina, la molécula liberada por una célula actúa localmente afectando a células diana próximas. En la señalización autocrina, la célula responde a una molécula señal producida por ella misma.



distancias, mientras que otras actúan localmente transfiriendo la información entre células vecinas. Además, las moléculas señalizadoras difieren en su modo de acción sobre las células diana. Algunas de estas moléculas son capaces de atravesar la membrana plasmática y se unen a receptores intracelulares en el citoplasma o en el núcleo, mientras que la mayoría se une a receptores que son expresados en la superficie de las células diana. En esta sección se tratarán los principales tipos de moléculas señalizadoras y algunos receptores intracelulares con los que interaccionan. El contenido de este capítulo se centra en los receptores de superficie celular y los mecanismos por medio de los cuales actúan para regular el comportamiento de las células.

Tipos de señalización célula-célula

La señalización celular tiene lugar bien a través de la interacción directa entre una célula y la célula vecina, bien mediante la acción de moléculas señalizadoras secretadas (**Fig. 16.1**). La señalización mediante interacción directa célula-célula (o célula-matriz extracelular) desempeña un papel crítico en la regulación del comportamiento de las células en los tejidos animales. Por ejemplo, las integrinas y cadherinas (que fueron tratadas en el capítulo anterior) funcionan no sólo como moléculas de adhesión celular, sino también como moléculas señalizadoras que se unen a células adyacentes o a la matriz extracelular y regulan la proliferación y supervivencia celular en respuesta al contacto célula-célula o célula-matriz extracelular. Además, las células expresan variedad de receptores de superficie que interaccionan con las moléculas señalizadoras de superficie de las células vecinas. Este tipo de señalización mediante interacción directa célula-célula desempeña un papel fundamental en la regulación de las múltiples interacciones que tienen lugar entre los distintos tipos celulares durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de los tejidos adultos.

Los diferentes tipos de señalización mediante moléculas secretadas se suelen dividir en tres grandes clases en función de la distancia recorrida por la molécula señalizadora. En la **señalización endocrina**, las moléculas señalizadoras (**hormonas**) son secretadas por células endocrinas especializadas y se transportan a través de la circulación, actuando sobre células diana localizadas en lugares alejados en el organismo. Un ejemplo clásico lo proporciona la hormona esteroidea estrógeno, que es producida por el ovario y estimula el desarrollo y mantenimiento del sistema reproductor femenino y de los caracteres sexuales secundarios. En los animales se producen más de 50 hormonas distintas por las glándulas endocrinas, entre las que se incluyen la pituitaria, tiroides, paratiroides, páncreas, glándulas suprarrenales y gónadas.

A diferencia de las hormonas, algunas moléculas señalizadoras actúan localmente, afectando al comportamiento de las células próximas. En la **señalización paracrina**, una molécula liberada por una célula actúa sobre las células diana vecinas. Un ejemplo lo proporciona la acción de los neurotransmisores que transportan la señal entre células nerviosas en la sinapsis. Por último, algunas células responden frente a señales que producen ellas mismas. Un ejemplo importante de esta **señalización autocrina** es la respuesta de las células del sistema inmune de los vertebrados frente a antígenos extraños. Algunos tipos de linfocitos T responden a la estimulación antigénica

ANIMACIÓN 16.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a16.1

Señalización mediante moléculas secretadas. Durante la señalización endocrina, las hormonas actúan sobre células distantes; en la señalización paracrina, una molécula liberada por una célula actúa sobre dianas cercanas; y en la señalización autocrina una célula produce una molécula señalizadora a la que además responde.

sintetizando un factor de crecimiento que induce su propia proliferación, lo que supone, por tanto, el aumento del número de linfocitos T con capacidad de respuesta y la amplificación de la respuesta inmune. También merece la pena destacar que una señalización autocrina anormal suele contribuir al crecimiento incontrolado de las células cancerosas (véase Cap. 19). En este caso, la célula cancerosa produce un factor de crecimiento frente al que es susceptible, induciendo continuamente su proliferación incontrolada.

Hormonas esteroideas y superfamilia de receptores de esteroides

Como ya se ha comentado, todas las moléculas señalizadoras actúan mediante la unión a receptores que son expresados por las células diana. En muchos casos, estos receptores se expresan en la superficie de la célula diana, pero otros receptores son proteínas intracelulares que se localizan en el citosol o en el núcleo. Estos receptores intracelulares interaccionan con moléculas señalizadoras pequeñas e hidrofóbicas que son capaces de difundir a través de la membrana plasmática. Las **hormonas esteroideas** son el típico ejemplo de este tipo de moléculas señalizadoras, entre las que también se incluyen la hormona tiroidea, la vitamina D_3, y el ácido retinoico (**Fig. 16.2**).

Las hormonas esteroideas (que incluyen a la testosterona, estrógeno, progesterona, los corticosteroides y la ecdisona) se sintetizan a partir del colesterol. La **testosterona**, **estrógeno** y **progesterona** son esteroides sexuales que son producidos por las gónadas. Los **corticosteroides** son producidos por la glándula suprarrenal. Estos incluyen a los **glucocorticoides**, que actúan sobre distintos tipos de células estimulando la producción de glucosa, y los **mineralocorticoides**, que actúan sobre el riñón regulando el equilibrio salino e hídrico. La **ecdisona** es una hormona de insectos que desempeña un papel fundamental en el desarrollo activando la metamorfosis de la lar-

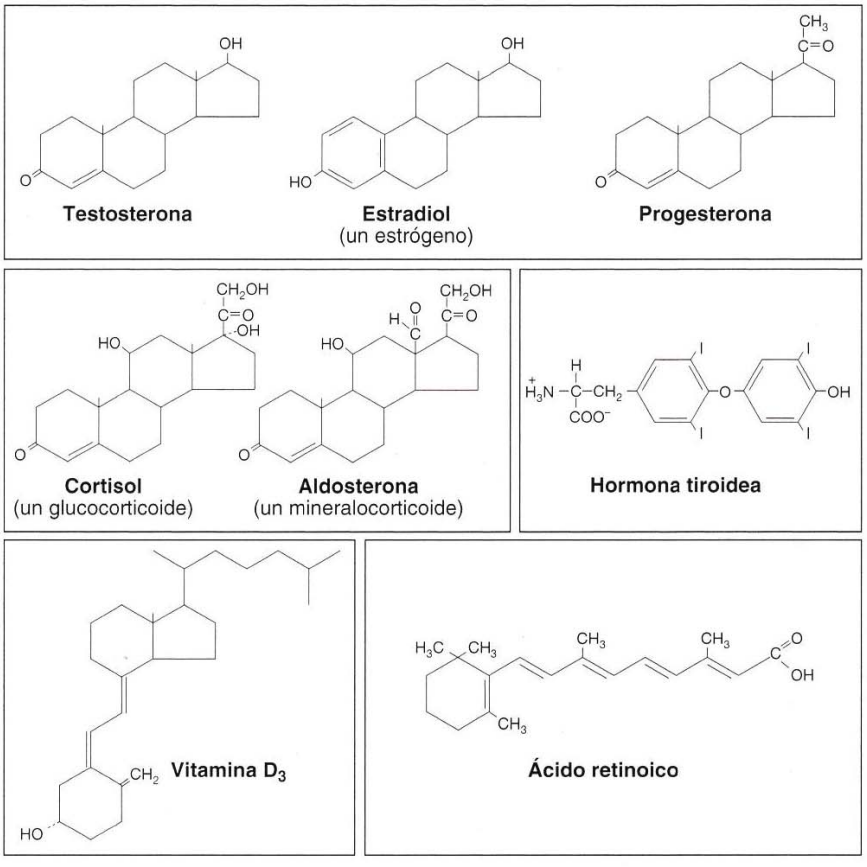


FIGURA 16.2 Estructura de las hormonas esteroideas, hormona tiroidea, vitamina D_3 y ácido retinoico. Los esteroides incluyen a las hormonas sexuales (testosterona, estrógeno y progesterona), glucocorticoides y mineralocorticoides.

va a adulto. Los **brasinosteroides** son hormonas esteroídicas específicas de plantas que controlan un cierto número de procesos del desarrollo, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular.

Aunque la hormona tiroidea, la vitamina D_3 y el ácido retinoico son estructural y funcionalmente diferentes a los esteroides, comparten un mecanismo de acción común en las células diana. La **hormona tiroidea** se sintetiza a partir de la tirosina en la glándula tiroidea; desempeña un papel importante en el desarrollo y en la regulación del metabolismo. La **vitamina D_3** regula el metabolismo del calcio y el crecimiento del hueso. El **ácido retinoico** y sus derivados (**retinoides**), sintetizados a partir de la vitamina A, juegan un papel importante en el desarrollo de los vertebrados.

Debido a su carácter hidrofóbico, las hormonas esteroideas pueden entrar en las células por difusión a través de la membrana plasmática. El paso de las hormonas tiroideas a través de la membrana plasmática está facilitado por proteínas transportadoras. En el interior de la célula, los corticoesteroides, la hormona tiroidea, la vitamina D_3 y el ácido retinoico se unen a receptores intracelulares expresados por las células sensibles a hormonas. Estos receptores, que son miembros de una familia de proteínas denominada **superfamilia de los receptores de esteroides**, son factores de transcripción que contienen dominios similares implicados en la unión al ligando, en la unión al ADN y en la activación de la transcripción. La unión al ligando regula su función como activadores o represores de sus genes diana, por lo que las hormonas esteroideas y moléculas relacionadas son reguladores directos de la expresión génica.

La unión al ligando tiene efectos distintos según los diferentes receptores. Algunos miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides son inactivos en ausencia de hormonas. Por ejemplo, el receptor de glucocorti-

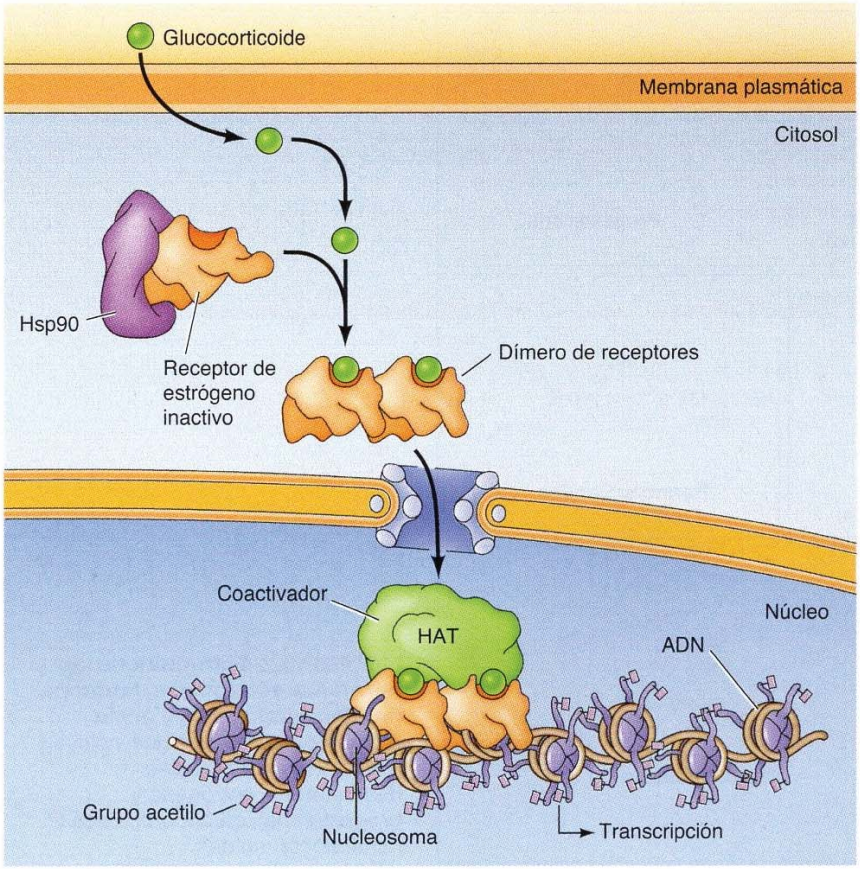


FIGURA 16.3 Acción de los glucocorticoides. Los glucocorticoides se difunden a través de la membrana plasmática y se unen al receptor de glucocorticoides. En ausencia de su ligando, el receptor se une a Hsp90 en el citoplasma. La unión de una molécula de glucocorticoide desplaza a Hsp90 del receptor y permite la formación de dímeros de receptores. Los receptores activados se traslocan al núcleo, se unen al ADN y se asocian a factores coactivadores con actividad de histona acetiltransferasa (HAT) para estimular la transcripción de los genes diana.

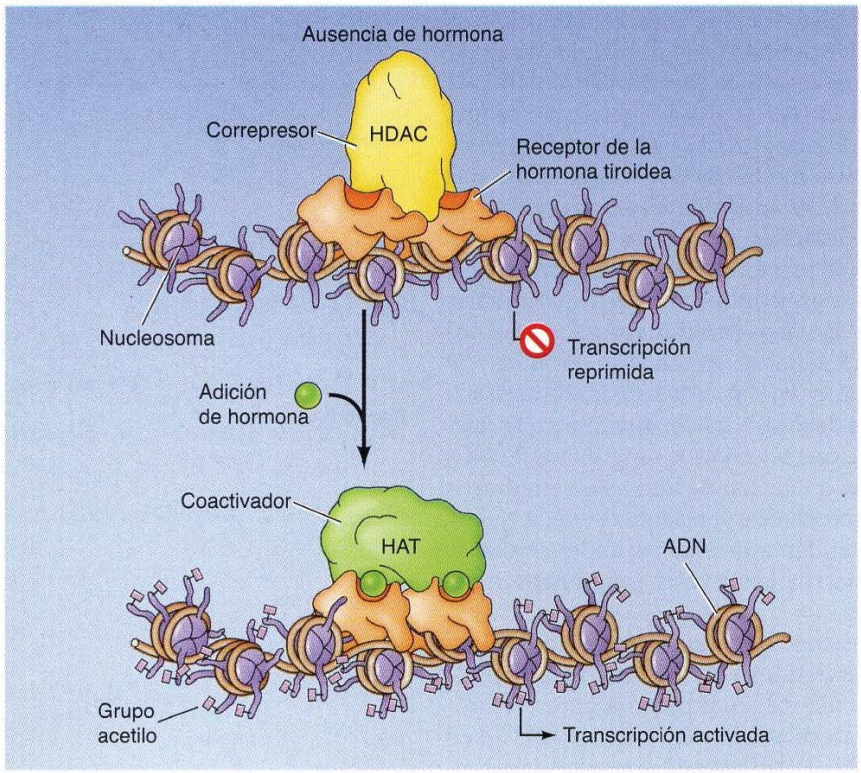


FIGURA 16.4 Regulación génica mediada por el receptor de la hormona tiroidea. El receptor de la hormona tiroidea se une al ADN tanto en ausencia como en presencia de la hormona. Sin embargo, la unión de la hormona cambia la función del receptor, de represor a activador de la transcripción de los genes diana. En ausencia de la hormona, el receptor se asocia con correpresores que poseen actividad histona deacetilasa (HDAC). En presencia de la hormona, el receptor se asocia con coactivadores que poseen actividad histona acetiltransferasa (HAT).

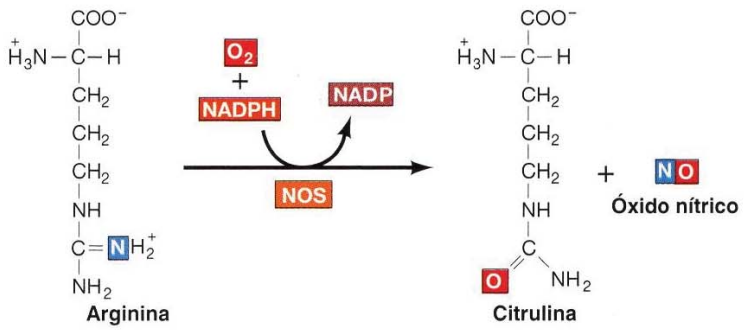
coides está unido a chaperonas Hsp90 en ausencia de la hormona (**Fig. 16.3**). La unión del glucocorticoide induce un cambio conformacional en el receptor, desplazando a Hsp90 y dando lugar a la formación de dímeros de receptores que se unen a las secuencias reguladoras del ADN y activan la transcripción de los genes diana. En otros casos, el receptor se une al ADN tanto en presencia como en ausencia de la hormona, pero la unión de la hormona modifica la actividad del receptor como molécula reguladora de la transcripción. Por ejemplo, en ausencia de la hormona, el receptor de la hormona tiroidea está asociado con un complejo correpresor y reprime la transcripción de sus genes diana (**Fig. 16.4**). La unión de la hormona induce un cambio conformacional que resulta en la interacción del receptor con coactivadores en lugar de correpresores, desencadenando la activación transcripcional de los genes inducibles por la hormona tiroidea.

Óxido nítrico y monóxido de carbono

El gas sencillo óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora paracrina fundamental en los sistemas nervioso, inmune y circulatorio. Al igual que las hormonas esteroideas, el NO es capaz de difundir directamente a través de la membrana plasmática de sus células diana. Sin embargo, el fundamento molecular de la acción del NO es diferente al de la acción de las hormonas esteroideas; en vez de unirse a un receptor que regule la transcripción, el NO altera la actividad de enzimas diana intracelulares.

El óxido nítrico se sintetiza a partir del aminoácido arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa (**Fig. 16.5**). Una vez sintetizado, el NO difunde fuera de la célula y puede actuar localmente afectando a células próximas. Su acción se restringe a estos efectos locales ya que

FIGURA 16.5 Síntesis del óxido nítrico. El enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la formación de óxido nítrico a partir de arginina.



el NO es extremadamente inestable, con una vida media de sólo unos pocos segundos. La principal diana intracelular del NO es la **guanilil ciclasa**. El NO se une a un grupo hemo del centro activo de esta enzima, estimulando la síntesis del segundo mensajero **GMP cíclico** (un **segundo mensajero** es una molécula que transmite la señal desde un receptor al objetivo en el interior de la célula). Adicionalmente, el NO puede modificar directamente algunas proteínas diana mediante nitrosilación de residuos de cisterna (véase Fig. 9.43). Un ejemplo bien caracterizado de la acción del NO es la señalización de la dilatación de los vasos sanguíneos. El primer paso en este proceso es la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina, desde los terminales de las células nerviosas a la pared de los vasos sanguíneos. Estos neurotransmisores actúan sobre las células endoteliales estimulando la síntesis de NO. El NO difunde hasta las células vecinas del músculo liso donde activa la guanilil ciclasa, resultando en la síntesis de GMP cíclico, que induce la relajación de las células musculares y dilatación de los vasos sanguíneos. El NO, por ejemplo, es la señal responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos que conduce a la erección del pene. También es interesante destacar que el uso médico de la nitroglicerina en el tratamiento de enfermedades cardíacas está basado en su conversión a NO, el cual dilata los vasos sanguíneos incrementando el flujo sanguíneo al corazón.

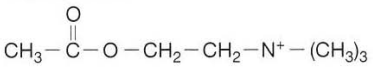
Otro gas sencillo, el monóxido de carbono (CO), también funciona como una molécula señalizadora en el sistema nervioso. El CO está íntimamente relacionado con el NO y parece que actúa de igual manera como neurotransmisor que como mediador de la vasodilatación. La síntesis del CO en células cerebrales, al igual que la del NO, es estimulada por neurotransmisores. Asimismo, el CO estimula a la guanilato ciclasa, la cual parece ser la principal diana fisiológica de la señalización mediante CO.

Neurotransmisores

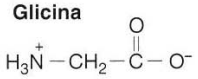
Los **neurotransmisores** llevan las señales entre las neuronas o desde las neuronas a algún otro tipo de célula diana (como las células musculares). Son un grupo diverso de moléculas pequeñas, hidrofílicas que incluye a la acetilcolina, glicina, glutamato, dopamina, epinefrina (adrenalina), norepinefrina, serotonina, histamina, y ácido γ-aminobutírico (GABA) (**Fig. 16.6**). La señal de liberación de los neurotransmisores es la llegada de un potencial de acción al terminal de la neurona (véase Fig. 14.21). Una vez liberados, los neurotransmisores difunden a través del espacio sináptico y se unen a los receptores de superficie de la célula diana. Hay que destacar que algunos neurotransmisores también actúan como hormonas. Por ejemplo, la epinefrina funciona como un neurotransmisor y como una hormona producida por la glándula suprarrenal para activar la hidrólisis del glucógeno en las células musculares.

Debido a que los neurotransmisores son hidrofílicos, no son capaces de atravesar la membrana plasmática de las células diana. Por ello, y a diferencia de las hormonas esteroideas y el NO o el CO, el mecanismo de actuación de los neurotransmisores es mediante la unión a receptores celulares de superficie. Muchos receptores de neurotransmisores son canales iónicos regulados por ligando, como el receptor de acetilcolina, mencionado en el Capítulo 14 (véase Fig. 14.22). El neurotransmisor que se une a estos receptores induce un cambio conformacional tal que se abre el canal iónico, lo que permite una variación del flujo de iones en la célula diana. Otros receptores de neurotransmisores están acoplados a proteínas G —un grupo importante de moléculas señalizadoras (tratadas posteriormente en este capítulo) que acoplan a los receptores de superficie celular a diversas respuestas intracelulares—. En el caso de los receptores de neurotransmisores, las proteínas G asociadas actúan regulando los canales iónicos.

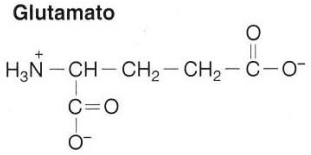
Acetilcolina



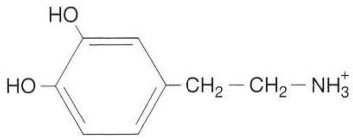
Glicina



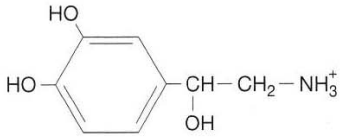
Glutamato



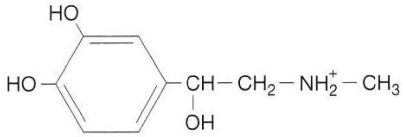
Dopamina



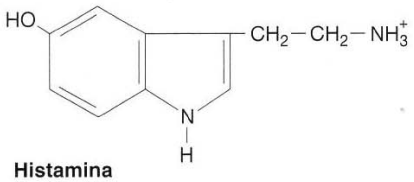
Norepinefrina



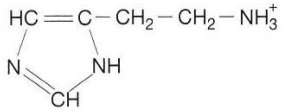
Epinefrina



Serotonina



Histamina



Ácido γ-aminobutírico
(GABA)

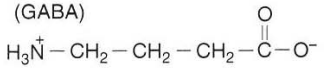


FIGURA 16.6 Estructura de neurotransmisores representativos. Los neurotransmisores son moléculas hidrofílicas que se unen a receptores celulares de superficie.

TABLA 16.1 Hormonas peptídicas, neuropéptidos y factores de crecimiento representativos

Molécula señal	Tamaño[a]	Función[b]
Hormonas peptídicas		
Insulina	A = 21, B = 30	Regulación de la absorción de la glucosa; estimula la proliferación celular
Glucagón	29	Estimula la síntesis de glucosa
Hormona del crecimiento	191	Estimula el crecimiento
Hormona estimulante del folículo (FSH)	α = 92, β = 118	Estimula el desarrollo de los oocitos y de los folículos ováricos
Prolactina	198	Estimula la producción de leche
Neuropéptidos y neurohormonas		
Sustancia P	11	Transmisión sináptica sensorial
Oxitocina	9	Estimula la contracción del músculo liso
Vasopresina	9	Estimula la reabsorción de agua en el riñón
Encefalinas	5	Analgésica
β-Endorfina	31	Analgésica
Factores de crecimiento		
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	118	Supervivencia y diferenciación neuronal
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	53	Proliferación de muchos tipos celulares
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	A = 125, B = 109	Proliferación de fibroblastos y de otros tipos celulares
Interleuquina-2	133	Proliferación de linfocitos T
Eritropoyetina	166	Desarrollo de glóbulos rojos

[a] El tamaño se expresa en número de aminoácidos. Algunas hormonas y factores de crecimiento están constituidos por dos cadenas polipeptídicas diferentes, las cuales se designan A y B o α y β.

[b] La mayoría de estas hormonas y factores de crecimiento ejercen otras funciones además de las arriba indicadas.

Hormonas peptídicas y factores de crecimiento

En los animales, las moléculas señalizadoras más diversas son los péptidos, cuyo tamaño oscila entre sólo unos pocos hasta más de 100 aminoácidos. Este grupo de moléculas señalizadoras incluye a las hormonas peptídicas, neuropéptidos y un amplio espectro de factores de crecimiento polipeptídicos (**Tabla 16.1**). Ejemplos bien conocidos de **hormonas peptídicas** son la insulina, el glucagón y las hormonas producidas por la glándula pituitaria (hormona del crecimiento, hormona estimulante del folículo, prolactina y otras).

Algunas neuronas secretan **neuropéptidos** en vez de las moléculas neurotransmisoras de pequeño tamaño a las que nos referimos en la sección anterior. Algunos de estos péptidos, como las **encefalinas** y las **endorfinas**, funcionan no sólo como neurotransmisores en la sinapsis sino también como **neurohormonas** que actúan sobre células alejadas. Las encefalinas y las endorfinas se han estudiado ampliamente debido a su actividad como analgésicos naturales que disminuyen la respuesta de dolor en el sistema nervioso central. Fueron descubiertas durante estudios acerca de la adicción a las drogas, y son compuestos producidos por el propio organismo que se unen a los mismos receptores de superficie de las células cerebrales a los que se une la morfina.

Los **factores de crecimiento** polipeptídicos incluyen una amplia gama de moléculas señalizadoras que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células animales. El primero de estos factores (el **factor de crecimiento nervioso**, o **NGF**) fue descubierto por Rita Levi-Montalcini en los años 50. El NGF pertenece a una familia de polipéptidos (denominados **neurotrofi-**

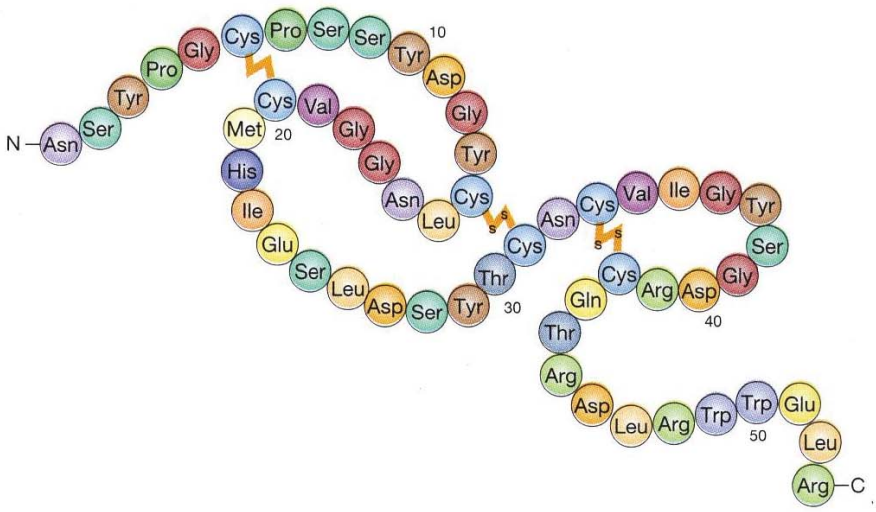


FIGURA 16.7 Estructura del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGF es una única cadena polipeptídica constituida por 53 aminoácidos. Se indican los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína. (A partir de G. Carpenter y S. Cohen, 1979. *Ann. Rev. Biochem.* 48:193.)

nas) que regulan el desarrollo y la supervivencia de las neuronas. Durante el transcurso de experimentos con el NGF, Stanley Cohen descubrió casualmente un factor diferente (denominado **factor de crecimiento epidérmico**, o **EGF**) que estimula la proliferación celular. El EGF, un polipéptido de 53 aminoácidos (**Fig. 16.7**), se considera el prototipo de una amplia serie de factores de crecimiento que desempeñan un papel fundamental en el control de la proliferación celular, tanto durante el desarrollo embrionario como en el organismo adulto.

Un buen ejemplo de la acción de los factores de crecimiento lo proporciona la actividad del **factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)** en la cicatrización de las heridas. El PDGF se almacena en las plaquetas y se libera durante la coagulación sanguínea en el lugar de la herida. Entonces, estimula la proliferación y el movimiento de fibroblastos en la proximidad del coágulo, lo que contribuye a la regeneración del tejido dañado. Por otra parte, el PDGF desempeña papeles clave en el desarrollo de diversos tejidos embrionarios. Los miembros de otro gran grupo de factores de crecimiento polipeptídicos (denominadas **citocinas**, como interleucina-2 y eritropoyetina) regulan el desarrollo y la diferenciación de las células sanguíneas y controlan la actividad de los linfocitos durante la respuesta inmune. Otros factores de crecimiento polipeptídicos (**factores de crecimiento anclados a la membrana**) permanecen asociados a la membrana plasmática en vez de ser secretados al fluido extracelular; por tanto, actúan específicamente como moléculas señalizadoras en las interacciones directas célula-célula.

Las hormonas peptídicas, los neuropéptidos y los factores de crecimiento no pueden atravesar la membrana plasmática de las células diana, por lo que actúan mediante la unión a receptores de superficie celulares, lo que se tratará posteriormente en este capítulo. Tal y como cabría esperar del papel crucial que desempeñan los factores de crecimiento polipeptídicos en el control de la proliferación celular, las alteraciones en la señalización mediada por factores de crecimiento son la fuente de multitud de enfermedades, incluyendo muchos tipos de cáncer. Por ejemplo, la expresión alterada del receptor de EGF es un factor importante para el desarrollo de diversos cánceres humanos, e inhibidores del receptor de EGF parecen ser agentes prometedores para el tratamiento del cáncer (véase Cap. 19).

Eicosanoides

Muchos tipos de lípidos sirven como moléculas señalizadoras que, a diferencia de las hormonas esteroideas, actúan mediante la unión a receptores de superficie celular. Los más importantes de este tipo de moléculas son los

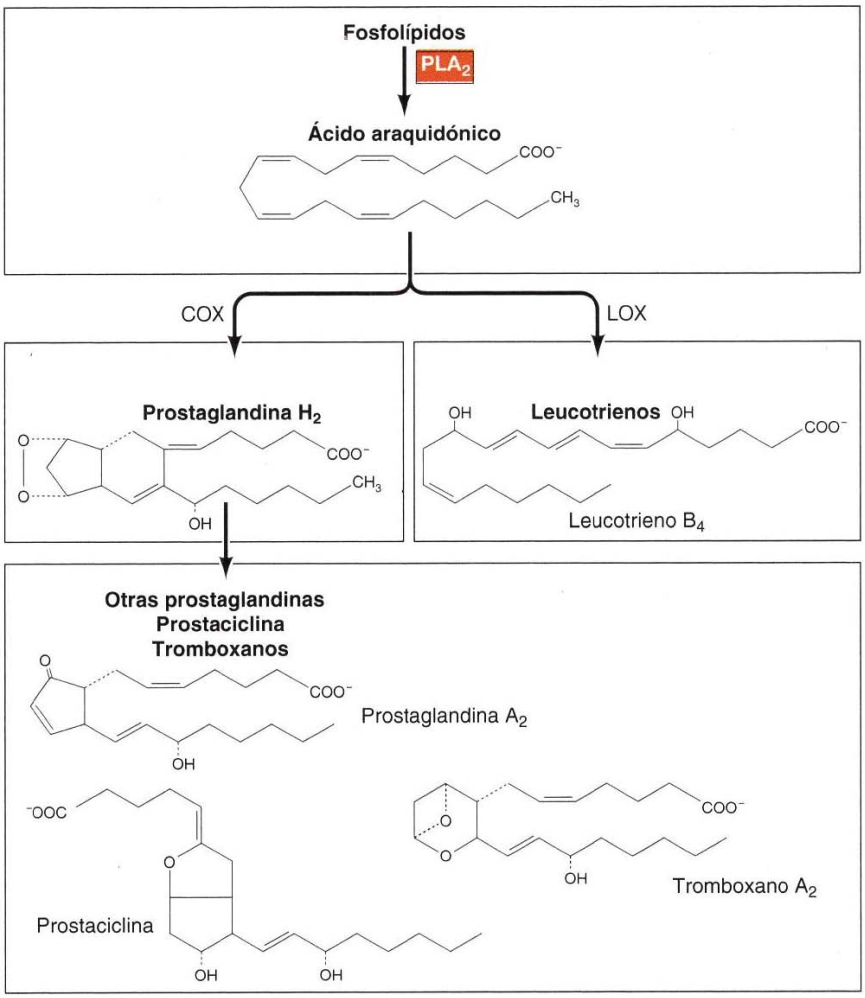


FIGURA 16.8 Síntesis y estructura de los eicosanoides. Los eicosanoides incluyen a las prostaglandinas, la prostaciclina, los tromboxanos y los leucotrienos. Son sintetizados a partir del ácido araquidónico, el cual se forma a partir de la hidrólisis de fosfolípidos catalizada por la fosfolipasa A_2 (PLA_2). El ácido araquidónico puede, a partir de aquí, seguir dos caminos metabólicos alternativos: una vía (activada por la ciclooxigenasa [COX]), lleva a la síntesis de las prostaglandinas, la prostaciclina y los tromboxanos, mientras que la otra (iniciada por la lipooxigenasa [LOX]) conduce a la síntesis de los leucotrienos.

miembros de una clase de lípidos denominados **eicosanoides**, que incluyen a las **prostaglandinas**, la **prostaciclina**, los **tromboxanos** y los **leucotrienos** (**Fig. 16.8**). Los eicosanoides se hidrolizan rápidamente, por lo que actúan localmente en vías de señalización autocrinas o paracrinas. Estimulan una gran diversidad de respuestas en las células diana, como por ejemplo la agregación plaquetaria, la inflamación y la contracción del músculo liso.

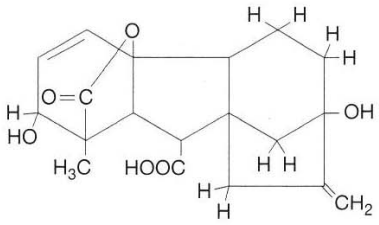
Todos los eicosanoides se sintetizan a partir del ácido araquidónico, que se forma a partir de los fosfolípidos. El primer paso en la vía que conduce a la síntesis tanto de prostaglandinas, prostaciclinas o tromboxanos es la transformación del ácido araquidónico en la prostaglandina H_2. Es de destacar que la enzima que cataliza esta reacción (la ciclooxigenasa o COX) es la diana de la aspirina y de otros medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID). Mediante la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas, la aspirina reduce la inflamación y el dolor. Mediante la inhibición de la síntesis de los tromboxanos, la aspirina reduce la agregación plaquetaria y la coagulación. Debido a esta acción, se suelen recetar pequeñas dosis diarias de aspirina para prevenir los accidentes cerebrovasculares. Además, se ha descubierto que la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos disminuyen la frecuencia del cáncer de colon tanto en modelos animales como en humanos, lo que se debe, posiblemente, a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas que estimulan la proliferación celular y promueven el desarrollo del cáncer. Debe tenerse en cuenta que existen dos formas de ciclooxigenasa:

COX-1 y COX-2. Se cree que COX-1 es principalmente responsable de la producción fisiológica normal de prostaglandinas y COX-2 de la producción incrementada de prostaglandina asociada con la inflamación y estados patológicos. Como consecuencia, los inhibidores selectivos de COX-2 han sido desarrollados en base al razonamiento de que dichos principios activos serían más eficaces y poseerían menos efectos secundarios que la aspirina o los NSAID convencionales, que inhiben tanto COX-1 y COX-2. Sin embargo, los inhibidores selectivos de COX-2 también pueden estar asociados con serios efectos secundarios, incluyendo una elevación del riesgo de padecer patologías cardiovasculares.

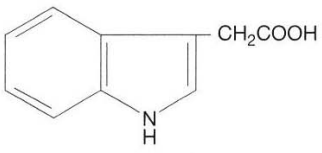
Hormonas vegetales

El crecimiento y el desarrollo de las plantas está regulado por corticoesteroides, hormonas peptídicas y un grupo de moléculas pequeñas denominadas **hormonas vegetales**. Los niveles de estas moléculas en la planta se modifican de manera característica por factores ambientales, como la luz o una infección, de tal manera que así se coordina la respuesta de los tejidos en distintas partes de la planta a las señales ambientales.

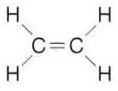
Las hormonas vegetales se suelen dividir en cinco clases principales: **giberelinas**, **auxinas**, **etileno**, **citoquinas** y **ácido abscísico** (**Fig. 16.9**). La primera hormona vegetal que se identificó fue la auxina, y los experimentos que condujeron a su descubrimiento los realizó Charles Darwin en los años 80 del siglo XIX. Uno de los efectos de las auxinas es inducir la elongación de la célula vegetal mediante el debilitamiento de la pared celular (véase Fig. 15.8). Además, las auxinas regulan otros muchos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la división celular y la diferenciación. Igualmente, las otras hormonas vegetales tienen diversos efectos sobre sus tejidos diana, que incluyen la elongación del tallo (giberelinas), la maduración del fruto (etileno), la división celular (citoquininas) y la inhibición de la germinación (ácido abscísico). Además de las cinco hormonas vegetales clásicas, estudios recientes han identificado otros compuestos que funcionan como hormonas en las plantas, incluido el óxido nítrico y los brasinoesteroides, hormonas esteroideas vegetales (brasinosteroides) tratado en secciones anteriores.



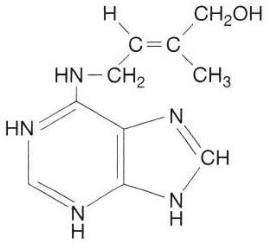
Ácido giberélico
(una giberelina)



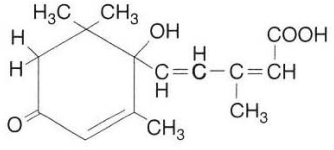
Ácido indol-3-acético
(una auxina)



Etileno



Zeatina
(una citoquinina)



Ácido abscísico

FIGURA 16.9 Hormonas vegetales. Representación de las estructuras de las cinco hormonas vegetales clásicas.

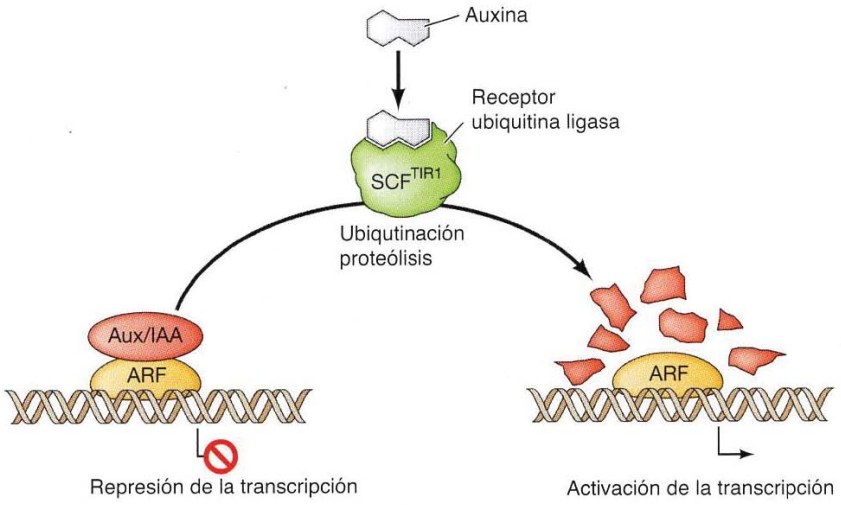


FIGURA 16.10 Señalización mediada por auxina. En ausencia de auxina (izquierda), un factor de transcripción (ARF) asociado a un correpresor (Aux/IAA) se une a los promotores de los genes regulados por auxina. Cuando está presente, la auxina se une a un receptor con actividad de ubiquitina ligasa (SCF^{TIR1}), lo que induce la ubiquitilación y la proteólisis de Aux/IAA, de modo que ARF puede activar la transcripción de los genes inducidos por auxina.

Las vías de señalización activadas por algunas hormonas vegetales, como etileno y las citoquinas, y los brasinoesteroides, emplean mecanismos conservados también en las células animales, como la activación de proteína quinasas, mientras que otras estimulan vías de señalización exclusivas de las plantas (véase Fig. 16.41). Otras hormonas vegetales, como auxina y giberelina, estimulan vías de señales encargadas de la activación de la degradación proteica que son exclusivas de las plantas (**Fig. 16.10**). La auxina, por ejemplo, controla la expresión génica a través de la unión y la activación de un receptor asociado a una ubiquitina ligasa (véase Fig. 9.46). En ausencia de auxina, un factor de transcripción (factor de respuesta a auxina o ARF), que se asocia a un correpresor (Aux/IAA), permanece unido a los genes regulados por dicha hormona. La estimulación de la SCF^{TIR1} ubiquitina ligasa por acción de la auxina induce la degradación del correpresor Aux/IAA y posibilita la activación de la transcripción de los genes diana del factor de respuesta a auxina.

Señalización de proteínas G y AMP cíclico

Como ya se ha visto, la mayoría de los ligandos responsables de la señalización célula-célula (incluidos los neurotransmisores, las hormonas peptídicas y los factores de crecimiento) se unen a receptores de la superficie de las células diana. Por tanto, un reto fundamental en la comprensión de la señalización célula-célula es desenmascarar los mecanismos mediante los que los receptores celulares de superficie transmiten las señales iniciadas por la unión del ligando. Como ya se describió en el Capítulo 14, algunos receptores de los neurotransmisores son canales iónicos regulados por ligando que controlan de manera directa el flujo de iones a través de la membrana plasmática. Otros receptores de superficie, entre los que se encuentran los receptores de las hormonas peptídicas y los de los factores de crecimiento, actúan regulando la actividad de enzimas intracelulares diana. Estas enzimas transmiten entonces las señales desde el receptor a una serie de dianas intracelulares adicionales, en un proceso denominado **transducción de señales intracelular**. Entre las dianas de estas vías de señalización se incluyen con frecuencia factores de transcripción que actúan para regular la expresión génica. La unión de ligandos a un receptor en la superficie de la célula inicia así una cadena de reacciones intracelulares, para llegar finalmente al núcleo de la célula objeto y alterar los programas de expresión génica. En el presente apartado y en las secciones siguientes del capítulo se analizan las funciones de algunos de los principales tipos de receptores de superficie celular y sus vías de señalización asociadas.

Proteínas G y receptores asociados a proteínas G

La familia más numerosa de receptores de la superficie celular transmite las señales al interior de la célula a través de proteínas que unen nucleótidos de guanina, denominadas **proteínas G**. Se han identificado más de mil de estos **receptores asociados a proteínas G,** entre los que se incluyen los receptores para muchas hormonas y neurotransmisores. Además, la familia de los receptores asociados a proteínas G incluye gran número de receptores responsables de las funciones del olfato, vista y gusto.

Los receptores asociados a proteínas G son un grupo de proteínas relacionadas estructural y funcionalmente, caracterizadas por tener siete hélices α transmembrana (**Fig. 16.11**). La unión del ligando al dominio extracelular de estos receptores induce un cambio conformacional que permite al dominio citosólico del receptor activar a una proteína G unida a la cara interna de la membrana plasmática. La proteína G activada se disocia del receptor y transmite la señal a una diana intracelular, que puede ser una enzima o un canal iónico.

El descubrimiento de las proteínas G se produjo a partir del estudio de hormonas (como la epinefrina) que regulan la síntesis del **AMP cíclico** (**AMPc**) en las células diana. Como se comentará a continuación, el AMPc es un segundo mensajero importante que actúa como mediador de la respuesta celular a diversas hormonas. En los años 70, Martin Rodbell y cols. realizaron el descubrimiento clave de que el GTP es necesario para la estimulación hormonal de la **adenilato ciclasa** (la enzima responsable de la formación de AMPc). Esto condujo a su vez al descubrimiento de que una proteína que une nucleótidos de guanina (la ya mencionada proteína G) era un intermediario de la activación de la adenilato ciclasa (**Fig. 16.12**). Desde entonces, se ha encontrado un vasto conjunto de proteínas G que actúan a modo de interruptores fisiológicos, regulando la actividad de diversas dianas intracelulares en respuesta a señales extracelulares.

Las proteínas G están constituidas por tres subunidades, designadas α, β y γ (**Fig. 16.13**). Frecuentemente se les denomina **proteínas G heterotriméricas** para distinguirlas de otras proteínas que unen nucleótidos de guanina, como la proteína Ras (véase Fig. 16.40) y las proteínas de unión a GTP relacionadas con Ras que intervienen en la importación (Ran, véase Fig. 10.10), el transporte vesicular (Arf y Rab, véanse Figs. 11.36 y 11.37) y el movimiento de las células (Rho, véase Fig. 13.21). La subunidad α de las proteínas G heterotriméricas se une a los nucleótidos de guanina, que regulan la actividad de la proteína G. En el estado inactivo, α se une al GDP formando un complejo con β y γ. La unión de la hormona induce un cambio conformacional tal en el receptor que el dominio citosólico de éste interacciona con la

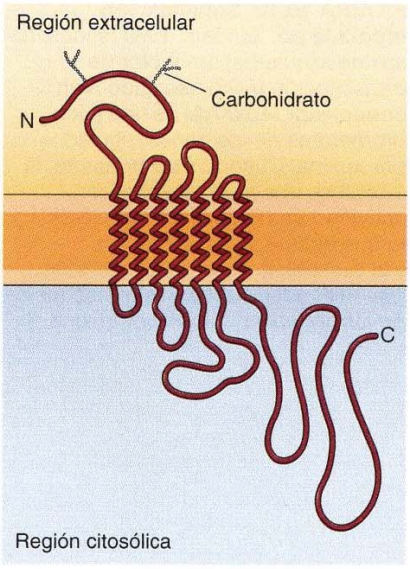


FIGURA 16.11 Estructura de un receptor asociado a proteína G. Los receptores asociados a las proteínas G se caracterizan por tener siete hélices α transmembrana.

ANIMACIÓN 16.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a16.2

Transducción de la señal. La mayor familia de receptores de la superficie celular transmite señales al interior celular activando a las proteínas G, que unen GTP y a continuación activan a las proteínas efectoras.

◆ Los perros tienen aproximadamente el triple de genes que codifican receptores olfativos funcionales que los seres humanos.

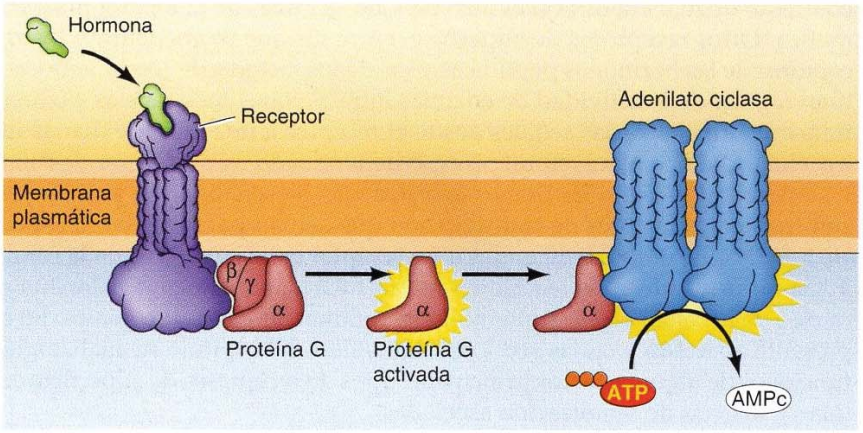
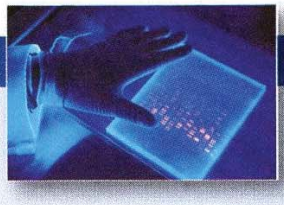


FIGURA 16.12 Activación hormonal de la adenilato ciclasa. La unión de la hormona induce la interacción del receptor con la proteína G. Entonces, la subunidad α activada de la proteína G se disocia del receptor y estimula a la adenilato ciclasa, que cataliza la conversión del ATP a AMPc.

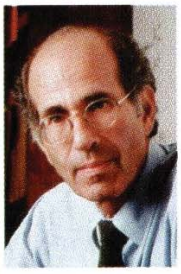


EXPERIMENTO CLAVE

Receptores acoplados a proteínas G y detección de olores

Linda Buck y Richard Axel
Columbia University, New York
Cell, 1991, Volumen 65, págs. 175-187

Linda Buck



Richard Axel

Imágenes: Linda Buck: Roland Morgan/ Fred Hutchinson Cancer Research Center; Richard Axel: Don Hamerman/Columbia University Medical Center.

Contexto

El sentido del olfato constituye uno de los sistemas más importantes a través del cual los animales perciben su entorno. Las neuronas periféricas de la nariz pueden reconocer miles de moléculas de olor diferentes y transmitir señales al cerebro, en el que se procesará esta información. La comprensión del sentido del olfato a nivel molecular dependía de la identificación de los receptores de las neuronas olfativas implicadas en la detección de moléculas de olor. En 1991, Linda Buck y Richard Axel descubrieron una extensa familia de receptores acoplados a proteínas G que intervenían en la detección y el reconocimiento de olores.

Anteriormente se había determinado que las moléculas de olor eran reconocidas por receptores localizados en los cilios de las neuronas olfativas. Lo que es más importante, se había demostrado que la exposición de cilios aislados procedentes de neuronas olfativas de rata a un amplio abanico de olores se asociaba a la estimulación de la adenil ciclasa y el aumento de las concentraciones de AMPc. Por otra parte, se observó que estos aumentos de dichas concentraciones inducidos por los olores dependían de la presencia de GTP, lo que indicaba que las moléculas de olor activaban receptores acoplados a proteínas G que estimulaban, a su vez, a la adenil ciclasa. El aumento de las concentraciones de AMPc inducía la apertura de canales de Na^+ en la membrana plasmática de las neuronas olfativas para iniciar un impulso nervioso.

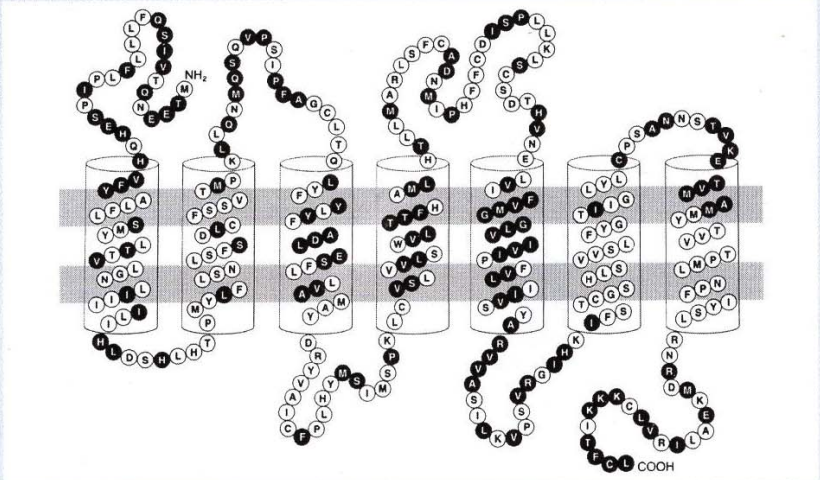
Buck y Axel trataron de aislar clones moleculares de los genes que codificaban los receptores de olores asumiendo que estos receptores pertenecerían a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. El éxito que obtuvieron con esos experimentos no sólo confirmó esta hipótesis, sino que además sentó los cimientos para el conocimiento de las bases moleculares de la discriminación de olores.

Experimento

El abordaje que Buck y Axel tomaron para clonar los genes de los receptores de olores estaba basado en tres suposiciones. En primer lugar, que los receptores de olores eran miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y compartían secuencias conservadas con otros miembros de la familia. En segundo lugar, los investigadores supusieron que los receptores de olores se codificarían por una familia génica amplia, lo que parece necesario para el reconocimiento de un elevadísimo número de estímulos olfativos. Finalmente, consideraron los receptores que se expresarían únicamente en las neuronas olfativas.

Por tanto, utilizaron cebadores oligonucleotídicos que correspondían a secuencias conservadas de receptores acoplados a proteínas G conocidos con el fin de amplificar los ARNm de las neuronas olfativas por medio de la transcriptasa inversa seguida de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (véase Fig. 4.22). Estos experimentos dieron como fruto un gran número de fragmentos de PCR, lo que confirmaba la expresión de una familia grande de genes para receptores acoplados a proteínas G en las neuronas olfativas. Los fragmentos amplificados se clonaron en vectores plasmídicos y se aislaron 18 clones diferentes de ADNc

Continúa en página siguiente



La familia de proteínas de receptores olfativos. La proteína codificada por uno de los clones de ADNc de receptores olfativos posee siete hélices a transmembrana que atraviesan la membrana plasmática. Los aminoácidos conservados en otros clones de receptores olfativos se muestran en blanco, mientras que los aminoácidos más variables se representan en negro.

EXPERIMENTO CLAVE

para su caracterización ulterior. Al utilizarlos como sondas en blots Northern, se constató la expresión de ARNm homólogos en las neuronas olfativas, pero no en otros tipos celulares, como células cerebrales, cardíacas, renales, hepáticas, pulmonares, ováricas, retinianas ni esplénicas. Asimismo, la secuenciación nucleotídica de 10 clones completos reveló que codificaban una familia diferente de proteínas con siete hélices α transmembrana típicas de los receptores acoplados a proteínas G (véase figura). Por último, la hibridación de los clones de ADNc al ADN genómico indicó que una amplia familia multigénica formada por cientos de genes codificaba los receptores olfativos.

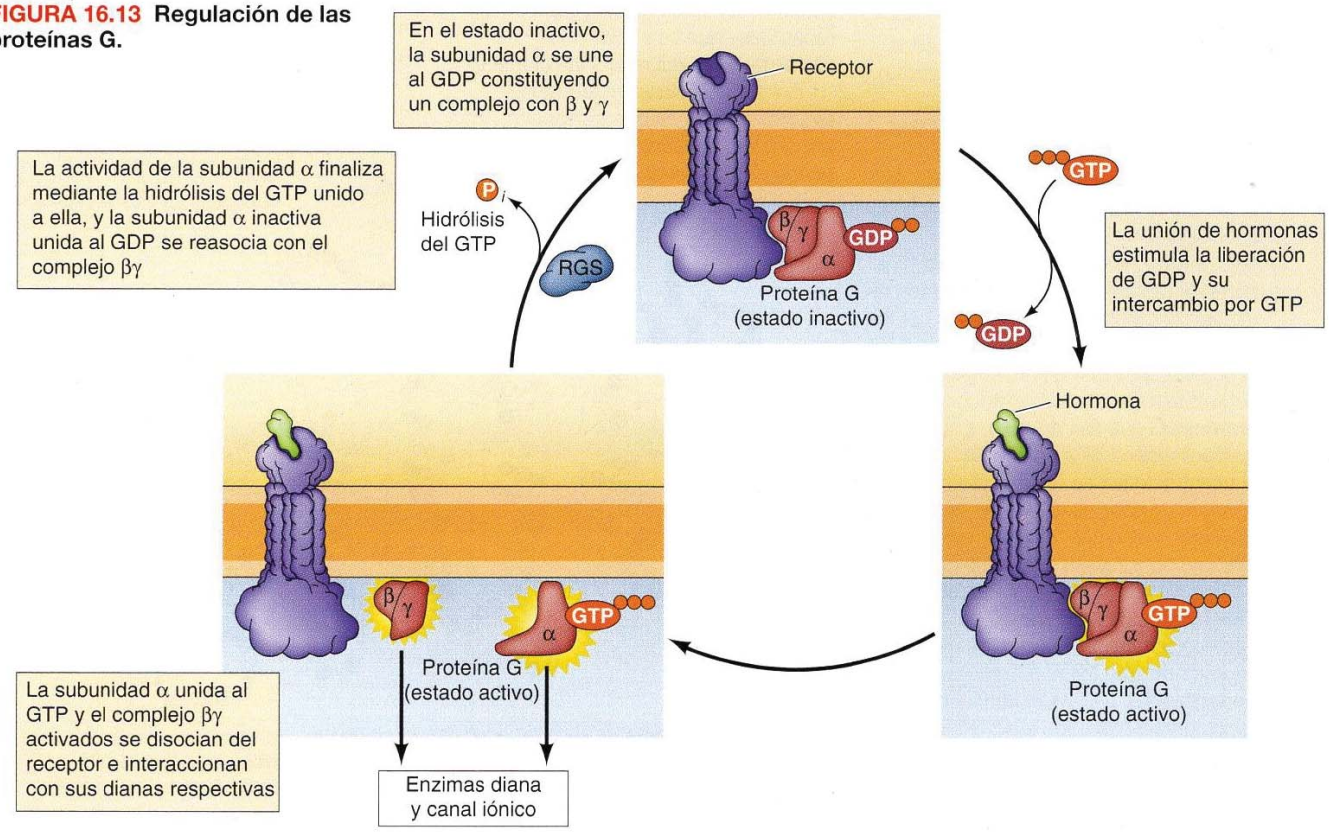
Impacto

Los receptores olfativos identificados por Buck y Axel representan la familia más extensa de receptores acoplados a proteínas G. Se han secuenciado más de 1.000 genes que codifican receptores olfativos en el ratón. Cabe destacar que la familia de genes de receptores olfativos es menos extensa en el ser humano y se compone de unos 400 genes funcionales, lo que concuerda con el menor sentido del olfato en el ser humano en comparación con el perro y los roedores.

La comprensión del funcionamiento del sentido del olfato ha sido posible gracias a la identificación de los receptores olfativos. Cada neurona olfativa expresa solamente un único receptor olfativo, que se une a distintas moléculas de olor, de modo que cada una de ellas es detectada por una combinación específica de receptores de un grupo definido de neuronas olfativas, que transmitirán la información captada al cerebro. No obstante, no se conoce aún la red de conexiones nerviosas que conducen la información desde las neuronas olfativas hasta el cerebro, el cual integra estos impulsos nerviosos y los interpreta como olores específicos. La identificación de estas redes de conexiones neuronales es objeto de una intensa investigación encaminada a comprender el procesamiento de información en el sistema nervioso.

proteína G. El receptor activado actúa entonces como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina para estimular la liberación del GDP y su intercambio por GTP. La subunidad α unida al GTP, ahora activada, se disocia de β y γ, que permanecen unidas constituyendo un complejo βγ. Tanto la subunidad α unida al GTP activa como el complejo βγ, interaccionan con

FIGURA 16.13 Regulación de las proteínas G.



sus dianas para dar lugar a una respuesta intracelular. La subunidad α se inactiva por la hidrólisis del GTP unido a ella, que es estimulada por las proteínas RGS (regulador de señalización de proteínas G), que actúan como proteínas de activación de la GTPasa (GAP) para las proteínas G heterotriméricas. La subunidad α inactiva (ahora unida a GDP) se reasocia con el complejo βγ, quedando así listo para el comienzo de un nuevo ciclo.

El genoma humano codifica 21 subunidades α, 6 subunidades β y 12 subunidades γ diferentes. Proteínas G distintas se asocian con receptores distintos, de tal manera que esta panoplia de proteínas G acopla los receptores a diferentes dianas intracelulares. Por ejemplo, la proteína G asociada al receptor de la epinefrina se denomina G_s, porque su subunidad α estimula a la adenilato ciclasa (véase Fig. 16.12). Las subunidades α y βγ de otras proteínas G actúan, sin embargo, inhibiendo a la adenilato ciclasa o regulando la actividad de otras enzimas diana.

Además de regular enzimas diana, tanto la subunidad α como las βγ de algunas proteínas G regulan directamente canales iónicos. Un buen ejemplo lo proporciona el efecto del neurotransmisor acetilcolina en el músculo cardíaco, que es diferente al ejercido en los nervios o en el músculo esquelético. El receptor de la acetilcolina en las células nerviosas o del músculo esquelético es un canal iónico regulado por ligando (véase Fig. 14.22). Las células del músculo cardíaco tienen un receptor de acetilcolina diferente, asociado a proteína G. Esta proteína G se denomina G_i porque su subunidad α *in*hibe a la adenilato ciclasa. Además, las subunidades β y γ de G_i actúan directamente sobre los canales de K^+ de la membrana plasmática causando su apertura, dando como resultado una contracción más lenta del músculo cardíaco.

Vía del AMPc: segundos mensajeros y fosforilación de proteínas

El papel del AMPc, un objeto principal de la señalización de proteínas G en las células de mamíferos, fue descubierto en 1958 por Earl Sutherland Jr. durante estudios de la hormona epinefrina, que estimula la descomposición de glicógeno en glucosa en las células musculares. Sutherland descubrió que la acción de la epinefrina estaba mediada por un aumento en la concentración intracelular de AMPc, lo que llevaba al concepto de que el AMPc es un segundo mensajero en la señalización hormonal (el primer mensajero es la propia hormona). El AMPc se forma a partir de ATP por la acción de la adenilato ciclasa (que es estimulada por G_s) y se degrada a AMP por la **AMPc fosfodiesterasa** (**Fig. 16.14**).

La mayor parte de los efectos del AMPc en las células animales están mediados por la acción de la **proteína quinasa dependiente de AMPc,** o proteína quinasa A, una enzima descubierta por Donal Walsh y Ed Krebs en 1968. La forma inactiva de la proteína quinasa A es un tetrámero consistente en dos subunidades reguladoras y dos catalíticas (**Fig. 16.15**). El AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras, lo que lleva a su disociación de las subunidades catalíticas Las subunidades catalíticas libres se vuelven en-

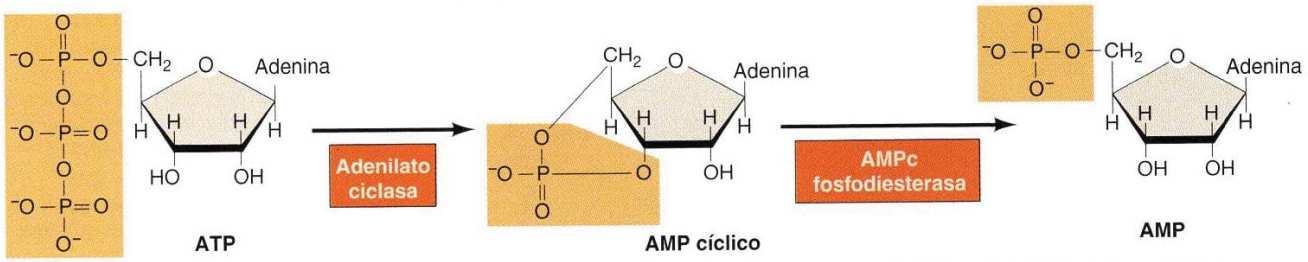
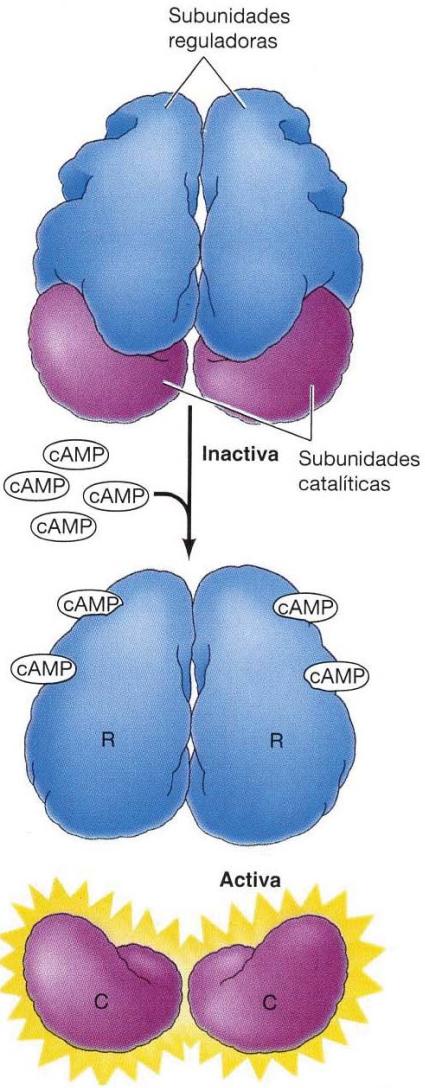


FIGURA 16.14 Síntesis y degradación del AMPc. El AMP cíclico (AMPc) se sintetiza a partir del ATP por la adenilato ciclasa y es degradado a AMP por la AMPc fosfodiesterasa.

FIGURA 16.15 Regulación de la proteína quinasa A. La forma inactiva de la proteína quinasa A está constituida por dos subunidades reguladoras (R) y por dos subunidades catalíticas (C). La unión del AMPc a las subunidades reguladoras induce un cambio conformacional que lleva a la disociación de las subunidades catalíticas, de lo que resulta la activación enzimática de éstas.



tonces activas enzimáticamente y adquieren capacidad para fosforilar residuos de serina en sus proteínas objeto.

En la regulación de la descomposición del glicógeno por la epinefrina, la diana principal de la proteína quinasa A es otra proteína quinasa, la fosforilasa quinasa, que es fosforilada y activada por la proteína quinasa A (**Fig. 16.16**). A su vez, la fosforilasa quinasa fosforila y activa la glicógeno fosforilasa, que cataliza la descomposición de glicógeno en glucosa-1-fosfato. Por otra parte, la proteína quinasa A fosforila e inhibe la enzima glicógeno sintasa, que cataliza la síntesis del glicógeno. La elevación del AMPc y la acti-

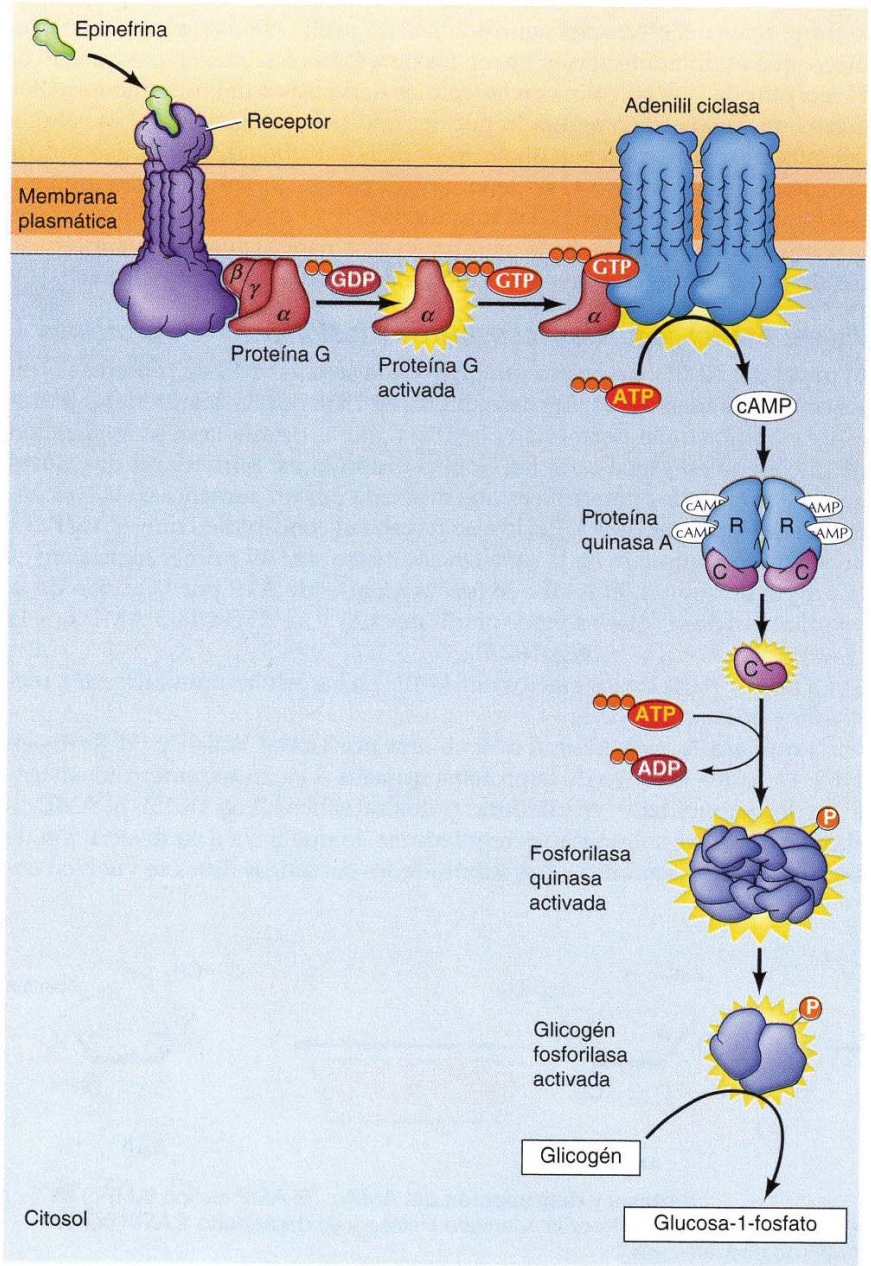


FIGURA 16.16 Regulación del metabolismo del glicógeno por la epinefrina. La estimulación de los receptores por la epinefrina conduce a la activación mediada por la proteína G de la adenilato ciclasa. El AMPc activa la proteína quinasa A, que fosforila y activa la fosforilasa quinasa. A continuación, la fosforilasa quinasa fosforila y activa la glicógeno fosforilasa, que cataliza la descomposición de glicógeno en glucosa-1-fosfato.

ANIMACIÓN 16.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a16.3

Amplificación de la señal. En una cascada de transducción de la señal, cada enzima activada en un estadio de la cascada puede activar numerosas moléculas de la siguiente enzima, amplificando rápidamente la respuesta al ligando unido a su receptor.

vación de la proteína quinasa A bloquean así ulteriores síntesis de glicógeno al mismo tiempo que estimulan la descomposición del glicógeno.

La cadena de reacciones que conduce desde el receptor de la epinefrina hasta la glucógeno fosforilasa proporciona un buen ejemplo de la amplificación de la señal durante la transducción de señales intracelular. Cada molécula de epinefrina activa un único receptor. Cada receptor, sin embargo, puede activar hasta 100 moléculas de G_s. Cada molécula de G_s activa a la adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis de muchas moléculas de AMPc. La señal continúa amplificándose puesto que cada molécula de proteína quinasa A fosforila muchas moléculas de fosforilasa quinasa, que, a su vez, fosforilan muchas moléculas de glucógeno fosforilasa. Por tanto, la unión de la hormona a un pequeño número de receptores da lugar a la activación de un número mucho mayor de enzimas diana intracelulares.

En muchas células animales, el aumento del AMPc activa la transcripción de unos genes diana específicos que contienen una secuencia reguladora de-

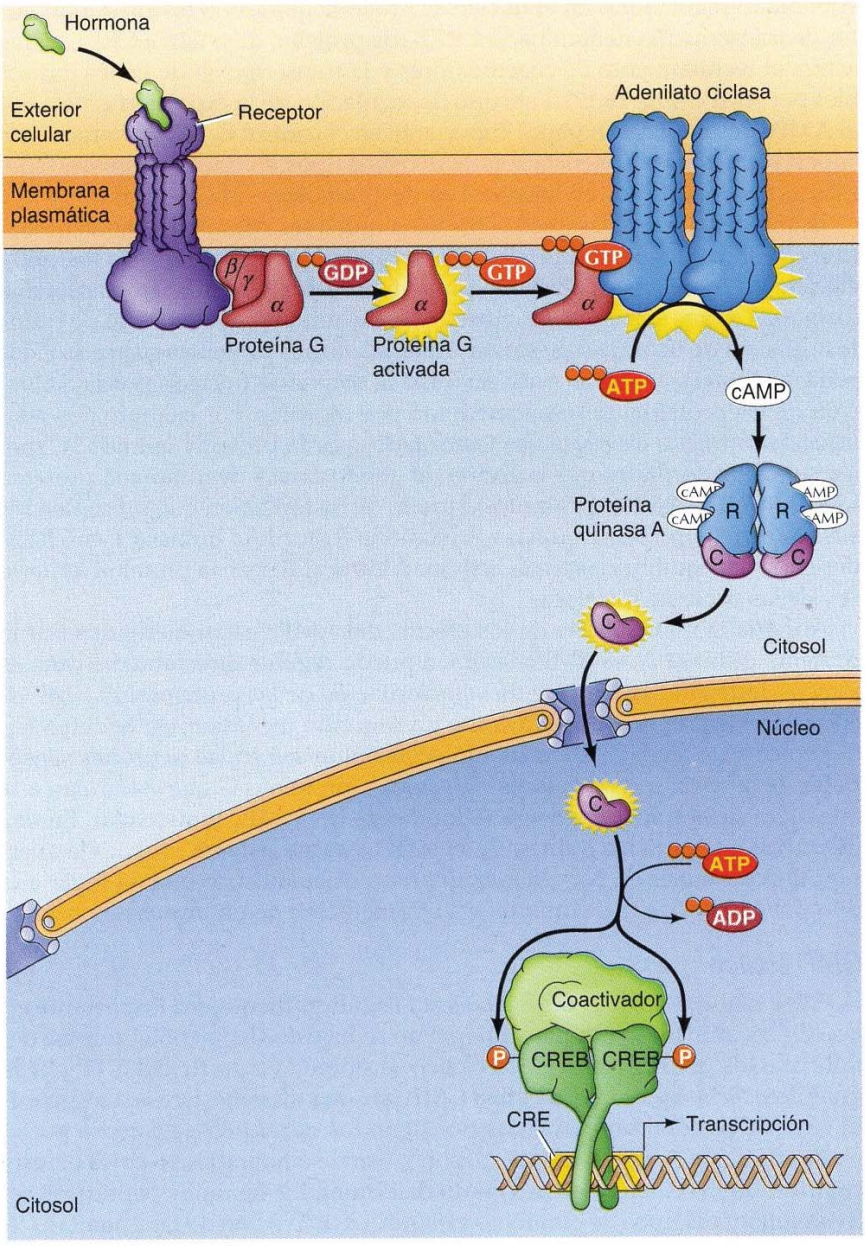


FIGURA 16.17 Expresión génica inducible por AMP cíclico. La estimulación de los receptores lleva a la activación mediada por la proteína C de la adenilato ciclasa, la síntesis de AMPc y la activación de proteína quinasa A. La subunidad catalítica libre de la proteína quinasa A se transloca al núcleo y fosforila el factor de transcripción CREB (proteína de unión a CRE), para llevar al reclutamiento de coactivadores y a la expresión de genes inducibles por AMPc.

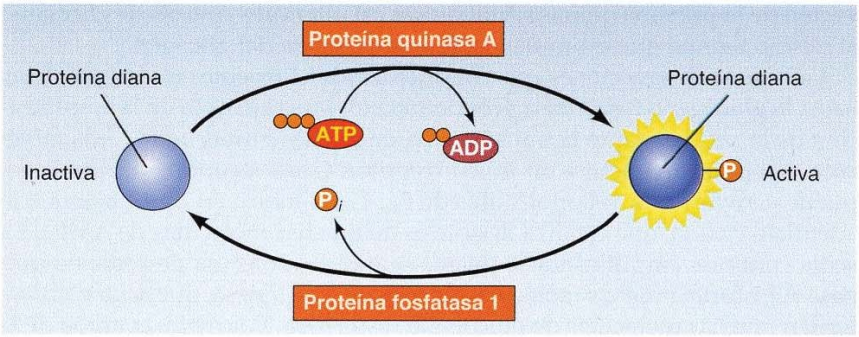


FIGURA 16.18 Regulación de la fosforilación de proteínas por la proteína quinasa A y por la proteína fosfatasa 1. La fosforilación de proteínas diana por la proteína quinasa A es revertida por la acción de la proteína fosfatasa 1.

nominada **elemento de respuesta a AMPc**, o **CRE**. En este caso, la señal desde el citoplasma al núcleo la lleva la subunidad catalítica de la proteína quinasa A, que es capaz de entrar en el núcleo tras su desacoplamiento de la subunidad reguladora. En el núcleo, la proteína quinasa A fosforila a un factor de transcripción denominado **CREB** (de proteína de unión a CRE), lo que activa al reclutamiento de coactivadores y la transcripción de genes inducibles por AMPc (**Fig. 16.17**). Este tipo de regulación de la expresión génica por el AMPc desempeña un papel importante en el control de la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de diversos tipos de células animales, además de estar implicada en los procesos de aprendizaje y la memoria.

Es importante señalar que las proteína quinasas, como la proteína quinasa A, no actúan de manera aislada en la célula. Por el contrario, la fosforilación de las proteínas es revertida rápidamente por la acción de las proteína fosfatasas. Otras son enzimas citosólicas que quitan grupos fosfato de restos fosforilados de tirosina o de serina/treonina de sus proteínas sustrato. Estas proteína fosfatasas sirven para finalizar la respuesta iniciada por la activación de las proteína quinasas mediada por receptor. Por ejemplo, los residuos de serina de las proteínas fosforilados por la proteína quinasa A, suelen ser desfosforilados por la acción de una fosfatasa denominada proteína fosfatasa 1 (**Fig. 16.18**). Por tanto, el grado de fosforilación que presentan los sustratos de la proteína quinasa A (como la fosforilasa quinasa y el CREB) depende del equilibrio entre la actividad intracelular de la proteína quinasa A y de las proteína fosfatasas.

Aunque la mayor parte de los efectos del AMPc están mediados por la proteína quinasa A, el AMPc también puede regular directamente canales iónicos, independientemente de la fosforilación de las proteínas. El AMP cíclico funciona de esta manera como un segundo mensajero en la detección de olores. Los receptores de las moléculas olorosas en las neuronas sensoriales de la nariz son receptores asociados a proteínas G que estimulan a la adenilato ciclasa, lo que genera un aumento del AMPc intracelular. En vez de activar a la proteína quinasa A, el AMPc en este sistema provoca la apertura de los canales de Na^+ en la membrana plasmática, lo que da lugar a la despolarización de la membrana y a la generación de un impulso nervioso.

GMP cíclico

El **GMP cíclico (GMPc)** también es un segundo mensajero importante en las células animales, aunque su papel no se ha estudiado con el mismo detalle que los del AMPc. El GMP cíclico se sintetiza a partir del GTP por la guanilato ciclasa y es degradado a GMP por una fosfodiesterasa. Las guanilil ciclasas pueden ser activadas por ligandos peptídicos, así como por el óxido nítrico y el monóxido de carbono, como se ha indicado antes en este capítulo. Tanto el óxido nítrico como determinados ligandos peptídicos activan diferentes tipos de guanilato ciclasas. La activación de las guanilato ci-

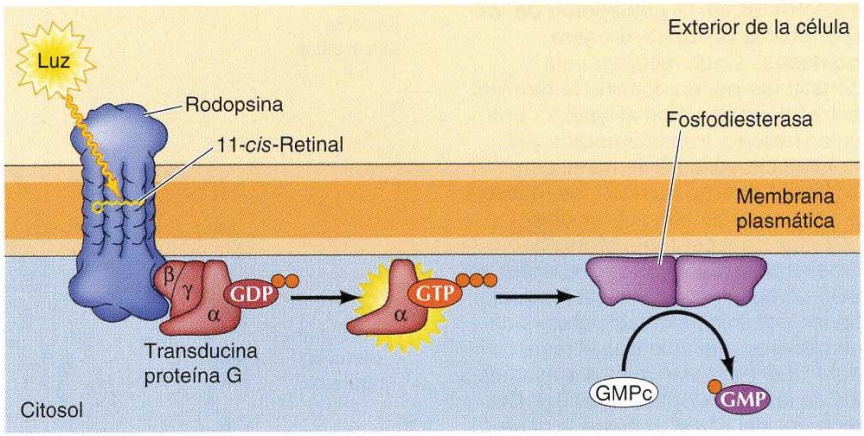


FIGURA 16.19 Papel del GMPc en la fotorrecepción. La absorción de luz por parte del retinal activa al receptor asociado a la proteína G rodopsina. Entonces, la subunidad α de la transducina se disocia de la subunidad βγ y activa a la GMPc fosfodiesterasa, lo que lleva a que disminuya el nivel intracelular de GMPc.

clasas aumenta el nivel del GMPc, el cual interviene como mediador de respuestas biológicas, como, por ejemplo, la vasodilatación. El GMPc ejerce su función a través de una proteína quinasa dependiente de GMPc, aunque también puede actuar sobre otras dianas, como por ejemplo canales iónicos y las fosfodiesterasas.

En el ojo de los vertebrados es donde está mejor caracterizada la acción del GMPc, donde actúa como el segundo mensajero responsable de convertir las señales visuales recibidas en forma de luz en impulsos nerviosos. El fotorreceptor en los bastones de la retina es un receptor asociado a una proteína G denominado **rodopsina** (**Fig. 16.19**). La rodopsina se activa por la absorción de luz por parte de la pequeña molécula asociada 11-*cis*-retinal, la cual se isomeriza a todo-*trans*-retinal, lo que induce un cambio conformacional en la proteína rodopsina. Entonces, la rodopsina activa a la proteína G **transducina**, y la subunidad α de la transducina activa a la **GMPc fosfodiesterasa**, lo que lleva a que disminuya el nivel intracelular de GMPc. Esta variación del nivel de GMPc en los bastones se traduce en un impulso nervioso debido a la acción del GMPc sobre los canales iónicos de la membrana, de manera similar a la acción del AMPc en la detección de los olores.

Tirosina quinasas y señalización por las vías de las quinasas MAP, las PI 3-quinasas y la fosfolipasa C/calcio

A diferencia de los receptores asociados a proteínas G, otros receptores de la superficie celular se encuentran directamente acoplados a enzimas intracelulares. La familia más grande de estos receptores acoplados a enzimas son los **receptores tirosina quinasas**, los cuales fosforilan las proteínas sustrato en los residuos de tirosina (receptores tirosina quinasas). Otros muchos receptores no son en sí mismos tirosina quinasas, pero actúan estimulando las tirosina quinasas intracelulares con las cuales se asocian de forma no covalente (no receptores tirosina quinasas). Las tirosina quinasas se han estudiado con especial detalle como elementos clave de las vías de señalización que intervienen en el control del crecimiento y la diferenciación de las células de animales. De hecho, la primera tirosina quinasa se descubrió durante estudios de la proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous (véase el experimento clave del Capítulo 9), que relaciona directamente la fosforilación de la tirosina con el crecimiento anómalo de las células cancerosas. Como se verá en el Capítulo 19, muchos de los fármacos que se desarrollan en la actualidad como nuevos tratamientos anticancerosos son inhibidores de las tirosina quinasas o de sus vías de señalización relacionadas.

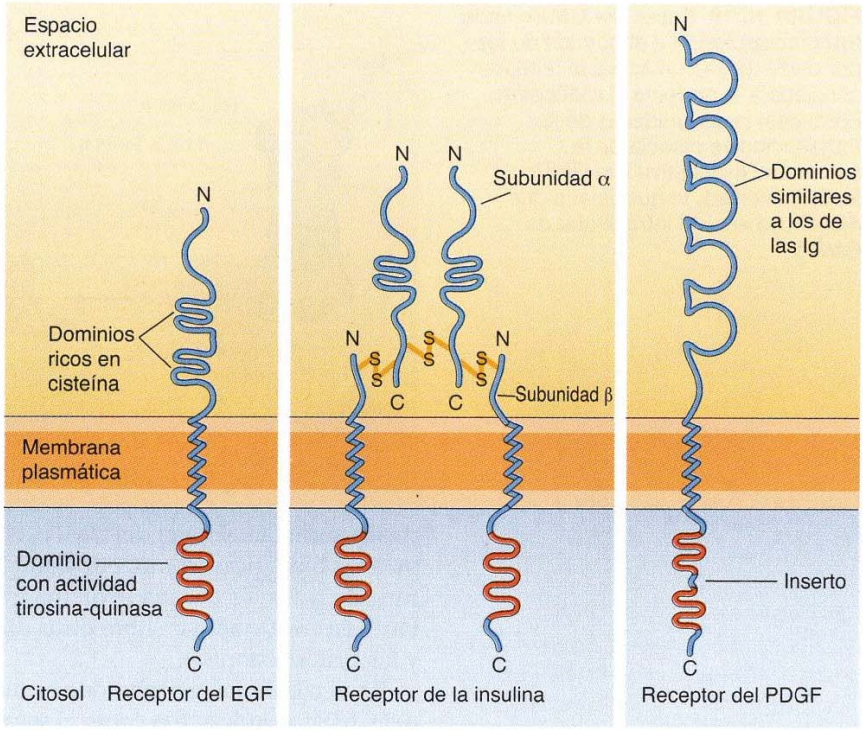


FIGURA 16.20 Organización de los receptores proteína-tirosina quinasas. Cada receptor está constituido por un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una única hélice α transmembrana y un domino citosólico C-terminal con actividad tirosina quinasa. Se muestra la estructura de tres subfamilias distintas de receptores proteína-tirosina quinasas. Tanto el receptor del EGF como el receptor de la insulina tienen dominios extracelulares ricos en cisteína, mientras que el receptor del PDGF tiene dominios semejantes a los de las inmunoglobulinas (Ig). Del receptor del PDGF, merece la pena señalar que su dominio quinasa está interrumpido por un inserto de unos 100 aminoácidos que no están relacionados con los aminoácidos habitualmente encontrados en los dominios catalíticos de las tirosina quinasas. La peculiaridad del receptor de insulina es que es un dímero constituido por dos pares de cadenas polipeptídicas (denominadas α y β).

Receptores proteína-tirosina quinasa

Los **receptores tirosina quinasas** incluyen los receptores de la mayor parte de los factores de crecimiento polipeptídicos, con lo que establecen claramente la fosforilación de tirosinas como un mecanismo clave de señalización en la respuesta de las células a la estimulación del factor de crecimiento.

El genoma codifica 58 receptores tirosina quinasas, incluyendo los receptores para el EGF, NGF, PDGF, la insulina y muchos otros factores de crecimiento. Estos receptores comparten una estructura común: un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una única hélice α transmembrana, y un dominio citosólico C- terminal con actividad proteína-tirosina quinasa (**Fig. 16.20**). La mayoría de los receptores proteína-tirosina quinasas están constituidos por un único polipéptido, pero el receptor de la insulina y otros receptores relacionados son dímeros constituidos por dos pares de cadenas polipeptídicas. La unión del ligando (p. ej., un factor de crecimiento) al dominio extracelular de estos receptores activa el dominio quinasa citosólico, dando lugar a la fosforilación del propio receptor y de las proteínas diana intracelulares, que propagan la señal iniciada por la unión del factor de crecimiento.

El primer paso del proceso de señalización en la mayoría de los receptores tirosina quinasas es la dimerización del receptor inducida por ligando (**Fig. 16.21**). Algunos factores de crecimiento, como el PDGF o el NGF, son dímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas idénticas; estos factores de crecimiento inducen la polimerización a través de la unión simultánea a dos moléculas diferentes de receptor. Otros factores de crecimiento (como el EGF) son monómeros pero desencadenan la dimerización de receptores como resultado de la inducción de cambios conformacionales que facilitan las interacciones proteína-proteína entre los polipéptidos de los receptores.

La dimerización inducida por ligando conduce a la **autofosforilación** del receptor ya que las cadenas polipeptídicas del dímero se fosforilan la una a

VÍDEO 16.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v16.1

Receptores tirosina quinasas. Los receptores tirosina quinasas se unen a muchos factores de crecimiento polipeptídicos, citoquinas y hormonas para iniciar la transducción de señales.

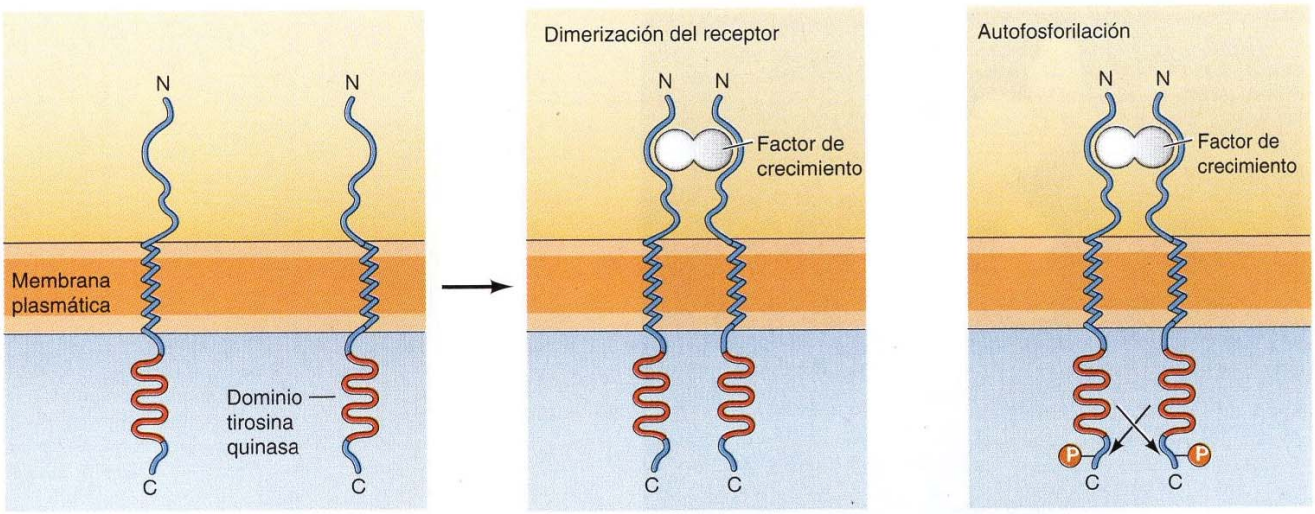


FIGURA 16.21 Dimerización y autofosforilación de los receptores tirosina quinasas. La unión del factor de crecimiento induce la dimerización del receptor, lo que da lugar a la autofosforilación del mismo ya que las dos cadenas polipeptídicas se fosforilan mutuamente.

la otra de manera cruzada (véase Fig. 16.21). La autofosforilación desempeña dos papeles fundamentales en la señalización a través de estos receptores. En primer lugar, la fosforilación de los residuos de tirosina del dominio catalítico es un mecanismo de regulación ya que incrementa la actividad proteína quinasa del receptor. En segundo lugar, la fosforilación de los residuos de tirosina que no pertenecen al dominio catalítico supone la generación de sitios de unión específicos para otras proteínas, a través de las que se transmitirá la señal al interior celular desde los receptores activados.

La asociación de estas moléculas señal intracelulares con los receptores tirosina quinasas se lleva a cabo a través de un dominio de la proteína que se une a péptidos específicos del receptor que contengan fosfotirosinas (**Fig. 16.22**). De estos dominios, los mejor conocidos se denominan **dominios SH2** (de *h*omología 2 con Src), ya que fueron identificados por primera vez en las tirosina quinasas relacionadas con Src, la proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous. Los dominios SH2 se componen de cien aminoáci-

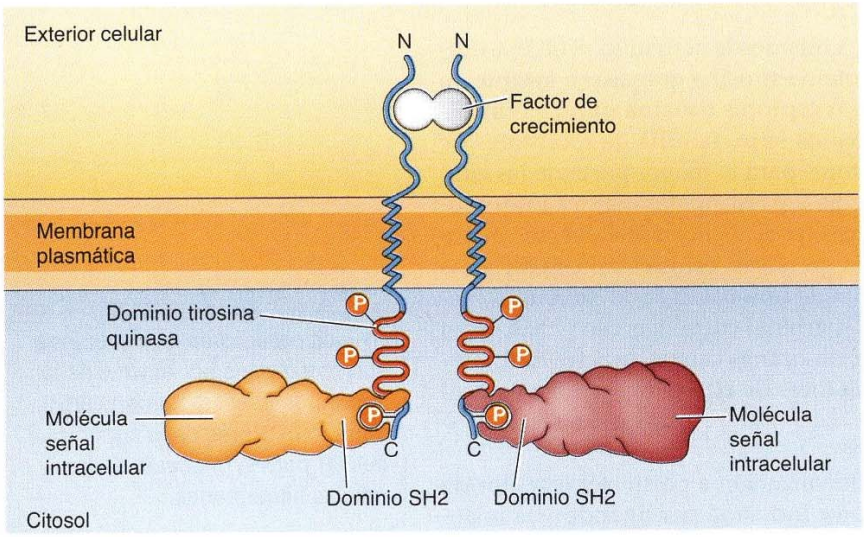


FIGURA 16.22 Asociación de moléculas señal intracelulares con los receptores tirosina quinasas. Los dominios SH2 se unen a péptidos específicos que contengan fosfotirosina de los receptores activados.

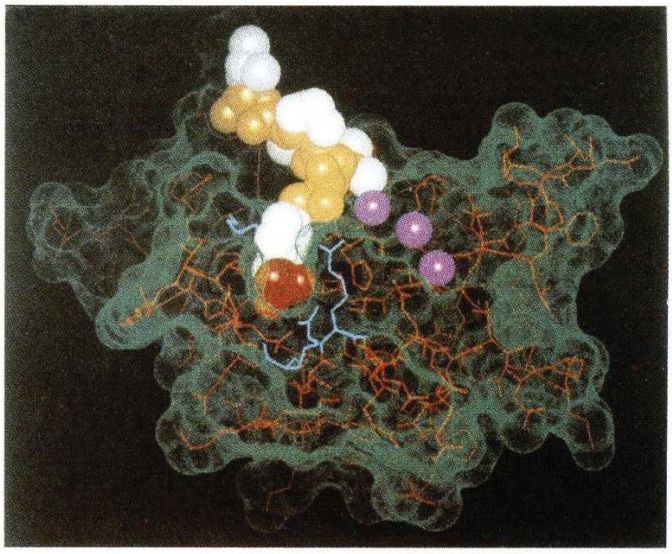


FIGURA 16.23 Complejo constituido por un dominio SH2 y un péptido con fosfotirosina. La cadena polipeptídica del dominio SH2 de la Src se muestra en color rojo y su superficie se indica con el punteado verde. Las bolas moradas muestran un surco en la superficie. Los residuos aminoacídicos que interaccionan con la fosfotirosina aparecen en azul. El péptido con fosfotirosina se ha representado por un modelo tridimensional de espacio lleno, que incluye esferas amarillas y blancas para indicar los átomos de la estructura principal y de las cadenas laterales, respectivamente, y esferas rojas para indicar el grupo fosfato. (A partir de G. Waksman y 13 colaboradores, 1992. *Nature* 358:646.)

dos aproximadamente, y se unen a cortas secuencias peptídicas específicas que contengan residuos de fosfotirosina (**Fig. 16.23**). La asociación de las proteínas con dominios SH2 o PTB, con los receptores proteína-tirosina quinasas activados tiene varios efectos: localiza a estas proteínas en la membrana plasmática, desencadena su asociación con otras proteínas, promueve su fosforilación y estimula su actividad enzimática. Por tanto, la asociación de estas proteínas con los receptores autofosforilados supone el primer paso en la transmisión intracelular de señales, que comenzó con la unión de los factores de crecimiento a la superficie celular.

No receptores tirosina quinasa

Muchos receptores, en vez de tener ellos mismos la actividad proteína-tirosina quinasa, actúan estimulando a proteína-tirosina quinasas a las que no están unidas covalentemente. Estos **no receptores tirosina quinasas** incluyen miembros de receptores (denominados **superfamilia de receptores de citoquinas**) que comprenden los receptores para la mayor parte de las citoquinas (p. ej., eritropoyetina e interleucina-2 y eritropoyetina) y a los receptores de algunas hormonas polipeptídicas (p. ej., la hormona del crecimiento). Al igual que los receptores tirosina quinasas, éstos están constituidos por un dominio N-terminal, extracelular, de unión a ligando, una única hélice α transmembrana, y un dominio C-terminal citosólico. Sin embargo, el dominio citosólico de los receptores de citoquinas carece de actividad catalítica conocida. En vez de esto, los receptores de citoquinas actúan en asociación con **proteína-tirosina quinasas no receptoras**, las cuales son activadas por la unión del ligando al receptor.

Se piensa que el primer paso de la señalización a partir del receptor de citoquinas es la dimerización del receptor inducida por ligando y la fosfo-

◆ Los receptores de citoquinas son empleados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como receptores de la superficie celular para la infección de las células inmunitarias.

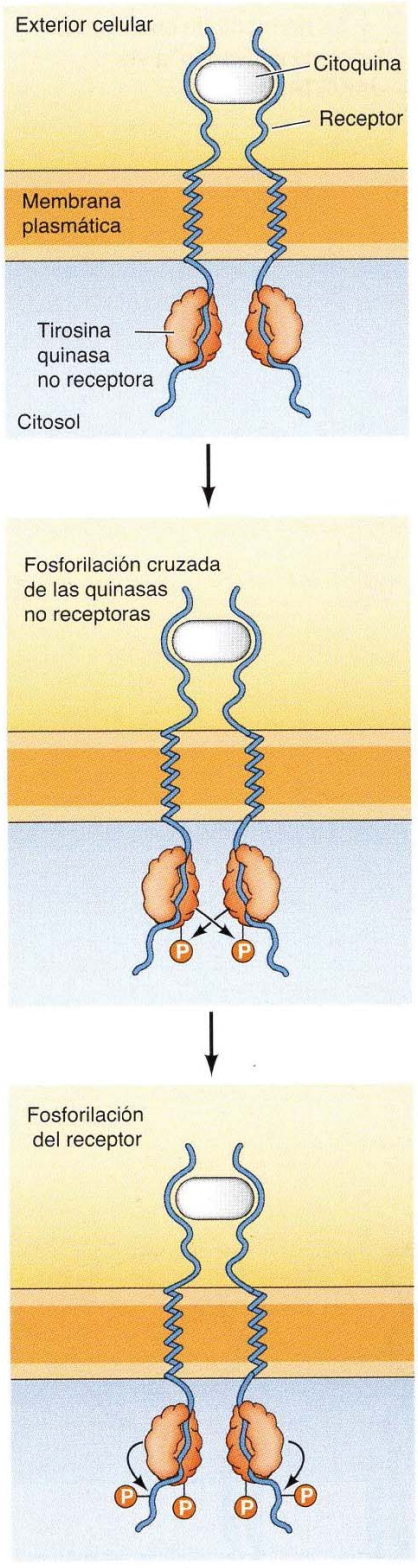


FIGURA 16.24 Activación de no receptores tirosina quinasas. La unión del ligando induce la dimerización de los receptores, y conduce a la activación de las tirosina quinasas no receptoras asociadas debido a una fosforilación cruzada. Seguidamente, las quinasas activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor, dando lugar a sitios de unión de fosfotirosina para las moléculas señal intracelulares.

rilación cruzada de las tirosina quinasas no receptoras asociadas (**Fig. 16.24**). Estas quinasas activadas fosforilarán al receptor, lo que proporcionará sitios de unión de fosfotirosina para las moléculas señal intracelulares que tengan dominios SH2. Por tanto, la combinación de los receptores de citoquinas más las tirosina quinasas no receptoras asociadas, funciona de la misma manera que lo hacen los receptores con actividad tirosina quinasa tratados en la sección anterior.

Las quinasas asociadas con receptores de citoquina pertenecen a la familia de las **quinasas de Janus** (o **JAK**), que constan de cuatro no receptores de proteína-tirosina quinasas relacionados. Las dianas principales de las quinasas JAK son las **proteínas STAT** (transductores de señal y activadores de transcripción), que se identificaron originalmente en estudios de señalización de receptores de citoquinas (**Fig. 16.25**). Las proteínas STAT forman una familia de siete factores de transcripción que contienen dominios SH2. Permanecen inactivas en células no estimuladas, donde se localizan en el citoplasma. La estimulación de receptores de citoquina lleva al reclutamiento de proteínas STAT, que se unen a través de sus dominios SH2 a secuencias que contienen fosfotirosina en los dominios citoplásmicos de los receptores.

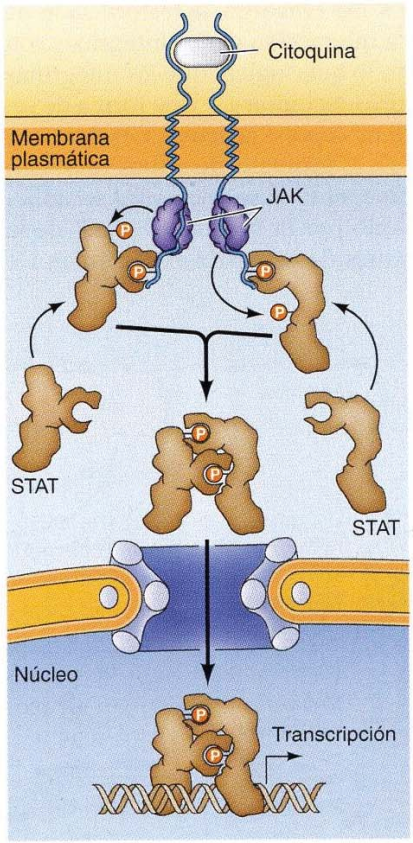


FIGURA 16.25 Vía JAK/STAT. Las proteínas STAT son factores de transcripción con dominios SH2, a través de los cuales se unen a aquellas secuencias que contengan fosfotirosina. En las células no estimuladas, las proteínas STAT se encuentran inactivas en el citosol. La estimulación de los receptores de citoquinas provoca que a estos se unan las proteínas STAT, siendo entonces fosforiladas por las tirosina quinasas JAK, asociadas al receptor. Las proteínas STAT fosforiladas se dimerizan y se translocan al núcleo, donde activan la transcripción de los genes diana.

Después de su asociación con receptores activados, las proteínas STAT son fosforiladas por quinasas de la familia JAK. La fosforilación de las tirosinas promueve la dimerización de proteínas STAT, que a continuación se translocan al núcleo, donde estimulan la transcripción de sus genes diana. Estudios adicionales han demostrado que las proteínas STAT se activan también después de los receptores tirosina quinasas, donde su fosforilación puede ser catalizada por los propios receptores o por no receptores quinasas asociados. Los factores de transcripción STAT actúan así como enlaces directos entre las citoquinas y los receptores de los factores de crecimiento en la superficie celular y en la regulación de la expresión génica en el núcleo.

◆ La hormona de crecimiento funciona activando la vía JAK/STAT.

Las tirosina quinasas no receptoras adicionales pertenecen a la familia **Src**, que está formada por Src y ocho proteínas estrechamente relacionadas. Como ya se ha indicado, Src fue inicialmente identificada como una proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous, y fue la primera proteína en la que se demostró la actividad tirosina quinasa, de modo que ha jugado un papel clave en los experimentos que han llevado a nuestra comprensión actual de la señalización celular. Los miembros de la familia Src juegan papeles clave en la señalización desencadenada de receptores de citoquinas, proteína-tirosina quinasas de receptores, desde los receptores de antígeno en los linfocitos B y T, y receptores que intervienen en las interacciones entre células y entre célula y matriz.

Tal como se indica en el Capítulo 15, las integrinas son los principales receptores responsables de la unión de las células a la matriz extracelular (véase Fig. 15.22). Además de su papel estructural, las integrinas actúan como receptores que activan las vías de señalización intracelulares, con lo que controlan el movimiento de las células y otros aspectos del comportamiento celular (lo que incluye la proliferación y la supervivencia de las células) en respuesta a las interacciones entre célula y matriz. Al igual que los receptores de citoquinas, las integrinas tienen colas citoplásmicas cortas que carecen de actividad enzimática intrínseca. Sin embargo, la fosforilación de la tirosina es una respuesta temprana a la interacción de las integrinas con los componentes de la matriz extracelular, lo que sugiere que las integrinas están relacionadas con los no receptores tirosina quinasas. Una forma de señalización con posterioridad a las integrinas supone la activación de un no receptor tirosina quinasa denominado **FAK** (quinasa de adhesión focal) (**Fig. 16.26**). Como se deduce de su nombre, el FAK se encuentra en adhesiones focales y rápidamente es fosforilado por la tirosina después de la unión de las integrinas con los componentes de la matriz extracelular. De

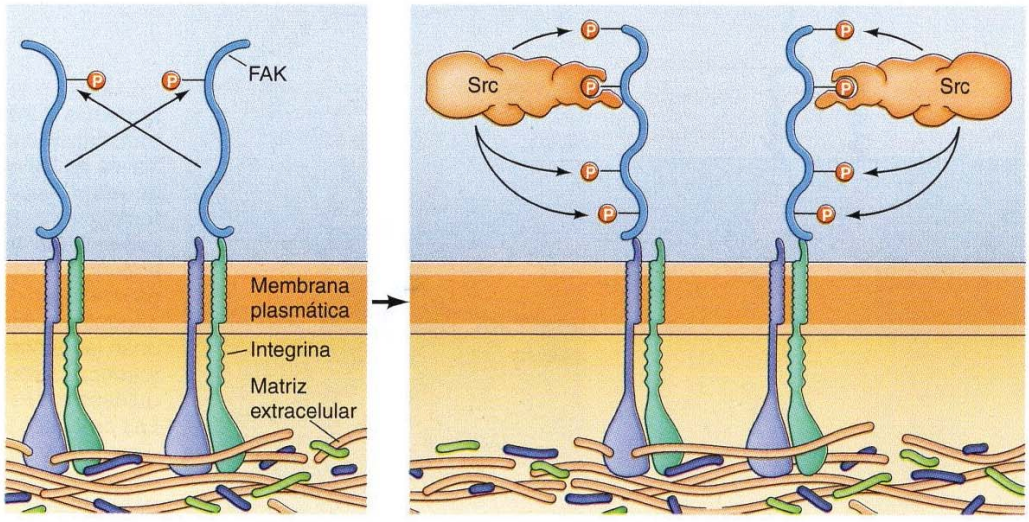
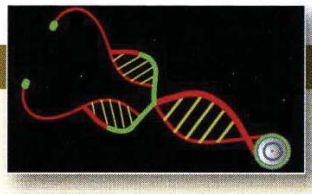


FIGURA 16.26
Señalización de integrinas. La unión de integrinas a la matriz extracelular lleva a una agrupación de integrinas y a la activación del no receptor tirosina quinasa FAK por autofosforilación. A continuación, Src se une al sitio de autofosforilación de FAK y fosforila FAK en residuos adicionales de tirosina, que actúan como puntos de unión para las moléculas de señalización que se activan más adelante en la vía.



MEDICINA MOLECULAR

Cáncer, transducción de señales y oncogenes *ras*

Enfermedad

El cáncer acaba con la vida de, aproximadamente, uno de cada cuatro americanos, contabilizándose 590.000 muertes al año en Estados Unidos. Hay más de 100 tipos de cáncer diferentes pero algunos son más comunes que otros. En este país, los cánceres letales más frecuentes son los de pulmón y colon que suman el 35% de las muertes totales por cáncer. Otros contribuyentes a la mortalidad por cáncer incluyen al cáncer de mama, próstata y páncreas, responsables aproximadamente del 6,9%, 6,9% y 4,7%, respectivamente, de las muertes por cáncer en Estados Unidos.

La característica común de todos los cánceres es la proliferación incontrolada de las células cancerosas, que acaban diseminándose por todo el organismo, invadiendo los órganos y tejidos sanos, lo que lleva a la muerte del paciente. La cirugía y la radioterapia son tratamientos eficaces para aquellos cánceres que están localizados, pero no alcanzan a aquellas células cancerosas que se han diseminado a zonas distantes en el organismo. Por tanto, el tratamiento de estos cánceres requiere de la quimioterapia. Por desgracia, los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad no actúan específicamente sobre las células cancerosas. La mayoría de ellos dañan el ADN o interfieren con la síntesis del ADN, por lo que también acaban con aquellas células sanas que tengan gran capacidad de división, como son las células epiteliales de la superficie del tracto digestivo y las células hematopoyéticas de la médula ósea. La toxicidad de estos medicamentos limita su efectividad, y muchos cánceres no se eliminan mediante aquellas dosis de quimioterapia que el paciente pueda tolerar. Por tanto, aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento del cáncer, casi la mitad de los pacientes a los que se diagnostica un cáncer acaban muriendo de dicha enfermedad.

Bases moleculares y celulares

La identificación de los genes virales que convierten a las células normales en células cancerosas, como el gen *src* virus del sarcoma de Rous, demostró por primera vez que los cánceres pueden ser causados por la acción de genes específicos (oncogenes). A partir del descubrimiento de que los oncogenes virales están relacionados con genes de las células sanas, se postuló la hipótesis de que los cánceres no inducidos por virus (que incluyen a la mayoría de los cánceres humanos) se deben a mutaciones en los genes de la célula sana, lo que da lugar a oncogenes de origen celular en vez de origen vírico. Estos oncogenes celulares se identificaron en los cánceres humanos en 1981. Seguidamente, se descubrió que los oncogenes humanos del cáncer de vesícula, pulmón y colon, estaban relacionados con los genes *ras*, previamente identificados en los virus causantes de sarcoma en ratas.

Aunque ahora se conocen muchos genes diferentes que desempeñan un papel importante en el desarrollo del cáncer, las mutaciones en los genes *ras* siguen siendo una de las alteraciones genéticas más comunes en los tumores humanos. Los oncogenes *ras* mutados se encuentran, aproximadamente, en el 25% de todos los cánceres humanos, incluyendo el 25% de cánceres de pulmón, el 50% de cánceres de colon y más del 90% de los cánceres de páncreas. Más aún, la acción de los oncogenes *ras* relaciona claramente el desarrollo del cáncer en el hombre con las alteraciones en las vías de señalización que regulan la proliferación celular. Las mutaciones que convierten a los genes *ras* en oncogenes causan la disminución de la hidrólisis del GTP por las proteínas Ras. Por consiguiente, las proteínas oncogénicas Ras mutadas permanecen en su forma activa, unida al GTP, en vez de alternar entre la forma activa e inactiva en respuesta a las señales extracelulares. Por tanto, las proteínas oncogénicas Ras están estimulando continuamente la vía de las quinasas ERK, lo que supone una proliferación celular continuada incluso en ausencia de aquellos factores de crecimiento necesarios para activar Ras y las demás señales intracelulares.

Prevención y tratamiento

El descubrimiento de oncogenes mutados en los cánceres humanos, lleva consigo la posibilidad de diseñar drogas dirigidas específicamente contra las proteínas oncogénicas. En principio, estas drogas podrían actuar selectivamente contra las células cancerosas, resultando menos tóxicas sobre las células normales que los agentes quimioterapéuticos convencionales. Debido a que *ras* se encuentra mutado con frecuencia en los cánceres humanos, las proteínas Ras han suscitado mucho interés como dianas potenciales de medicamentos.

Pólipo de colon humano (estadio temprano del cáncer de colon). Los oncogenes *ras* contribuyen al desarrollo de aproximadamente la mitad de todos los cánceres de colon. (E. P. Ewing, Jr., Centers for Disease Control.)

Como se analiza en el Capítulo 19, los medicamentos eficaces que se dirigen selectivamente frente a las células cancerosas han sido desarrollados recientemente frente a algunos oncogenes de proteína-tirosina quinasas, que actúan por encima de Ras. Una diversidad de principios activos adicionales están dirigidos frente a proteínas quinasas que actúan por debajo de Ras, como Raf. La identificación de oncogenes en tumores humanos, por tanto, ha abierto nuevas estrategias para el desarrollo racional de principios activos que actúan de forma eficaz y selectiva frente a las células cancerosas humanas actuando sobre vías de señalización responsables del desarrollo del cáncer.

Referencias

Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3637–3640.

Parada, L. F., C. J. Tabin, C. Shih and R. A. Weinberg. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297: 474–478.

igual forma que otras tirosina quinasas, la activación de FAK implica una autofosforilación inducida por la agrupación de integrinas ligadas a la matriz extracelular. La autofosforilación de FAK crea puntos de anclaje para moléculas de señalización que contienen dominios SH2, entre ellas los miembros de la familia Src y otras moléculas de señalización más adelante en la vía.

Las interacciones entre células, así como las producidas entre las células y la matriz extracelular, tienen funciones críticas en los organismos multicelulares. Por ejemplo, estas interacciones controlan la organización de las células en los tejidos, incluida la formación de láminas de célula epiteliales. Como se indica en el Capítulo 15, las interacciones entre células están mediadas por cuatro familias principales de moléculas de adhesión celular: las integrinas, las selectinas, los miembros de la superfamilia Ig y las cadherinas (véase Tabla 15.2). Al igual que las integrinas (que se analizaron anteriormente), los miembros de la superfamilia Ig y las cadherinas están vinculados con vías de señalización que controlan múltiples aspectos del comportamiento celular, al menos en parte por medio de la estimulación de no receptores tirosina quinasas, entre ellos los miembros de la familia Src.

Vía de las quinasas MAP

La señalización de las quinasas MAP es una de las principales vías de transducción de señales intracelulares activadas con posterioridad tanto para receptores como no receptores tirosina quinasas. La vía de las quinasas MAP se refiere a una cascada de proteína quinasas que está altamente conservada en la evolución y desempeña un papel central en la transducción de señales en todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta el ser humano. Los elementos centrales de esta vía son una familia de proteína-serina/treonina quinasas denominadas **quinasas MAP** (de *p*roteína quinasas *a*ctivadas por *m*itógenos) que se activan en respuesta a diversos factores de crecimiento y a otras moléculas señal. En las levaduras, las vías de las quinasas MAP controlan diversas respuestas celulares, entre las que se incluyen el apareamiento, la forma celular y la esporulación. En los eucariotas superiores (incluyendo *C. elegans*, *Drosophila*, ranas y mamíferos) las quinasas MAP son reguladores ubicuos del crecimiento y de la diferenciación celular.

Las quinasas MAP que se caracterizaron inicialmente en células de mamíferos pertenecen a la familia **ERK** (quinasas reguladas por señales extracelulares). La principal función de la señalización ERK en las células de mamíferos se descubrió en estudios de las proteínas **Ras**, que fueron identificadas por primera vez como proteínas oncogénicas de virus tumorales que provocan sarcomas en ratas (y de ahí el nombre de Ras, por virus de sarcoma en ratas). El interés en las proteínas Ras se intensificó notablemente en 1982 cuando se estableció por primera vez una relación entre las mutaciones en genes Ras y el desarrollo de cánceres humanos (como se analiza en el Capítulo 19). La importancia de Ras en la señalización intracelular quedó demostrada después por experimentos que mostraban que la microinyección de proteína Ras activa induce directamente la proliferación de células de mamíferos normales. Por el contrario, la interferencia con la función Ras por la microinyección de anticuerpos anti-Ras o la expresión de un mutante Ras negativo dominante bloquea la proliferación celular inducida por factores de crecimiento. Así pues, Ras no sólo es capaz de inducir el crecimiento anómalo característico de las células cancerosas, sino que es necesaria también para la respuesta de las células normales a la estimulación de los factores de crecimiento.

Las proteínas Ras son proteínas de unión a nucleótidos de guanina que actúan de forma análoga a las subunidades α de las proteínas G, alternando entre formas unidas a GDP inactivas y unidas a GTP activas (**Fig. 16.27**). En

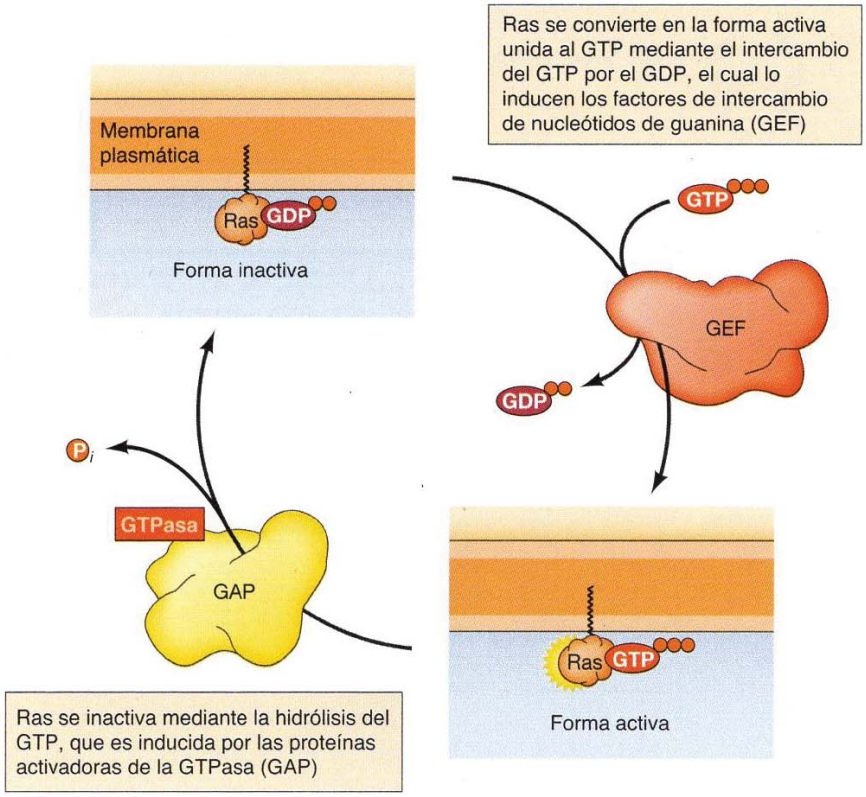


FIGURA 16.27 Regulación de las proteínas Ras. Las proteínas Ras alternan entre los estados inactivo, unidas al GDP, y activo, unidas al GTP.

contraste con las subunidades α de las proteínas G, Ras actúa como un monómero en vez de unirse a las subunidades βγ. La activación de Ras está mediada por **factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF)**, que inducen la liberación del GDP unido y su intercambio por el GTP. El complejo Ras-GTP se inactiva por la hidrólisis del GTP, estimulada por la interacción de Ras-GTP con **proteínas activadoras de la GTPasa (GAP)**. Es interesante destacar que las mutaciones de los genes *ras* en los cánceres humanos tienen como efecto la inhibición de la hidrólisis del GTP por las proteínas Ras. Por tanto, estas proteínas Ras mutantes permanecen continuamente en la forma activa unida al GTP, dando lugar a la proliferación incontrolada de las células cancerosas aun en ausencia de la estimulación por factores de crecimiento.

La mejor manera de comprender la activación de Ras es indicar que está mediada por los receptores tirosina quinasas (**Fig. 16.28**). La autofosforilación de estos receptores conduce a la unión de GEF Ras por medio de sus dominios SH2. Así se localizan los GEF en la membrana plasmática donde son capaces de interaccionar con las proteínas Ras, que se fijan a la cara interna de la membrana plasmática mediante los lípidos fijados al terminal C Ras (véase Fig. 14.10). Los GEF estimulan entonces el intercambio de GDP por GTP, lo que deriva en la formación del complejo Ras-GTP activo. En su forma activa ligada a GTP, Ras interacciona con una serie de proteínas efectoras, entre ellas la serina/treonina quinasa **Raf**. La interacción con Ras recluta Raf del citosol a la membrana plasmática, donde la Raf se activa por dimerización y fosforilación. Después, la Raf fosforila y activa una segunda proteína quinasa denominada **MEK (quinasa MAP/quinasa ERK)**. La MEK es una proteína quinasa de especificidad doble que activa los miembros de la familia ERK por fosforilación de los residuos de treonina y tirosina separados por un aminoácido (p. ej., treonina-183 y tirosina-185 de ERK2). Una

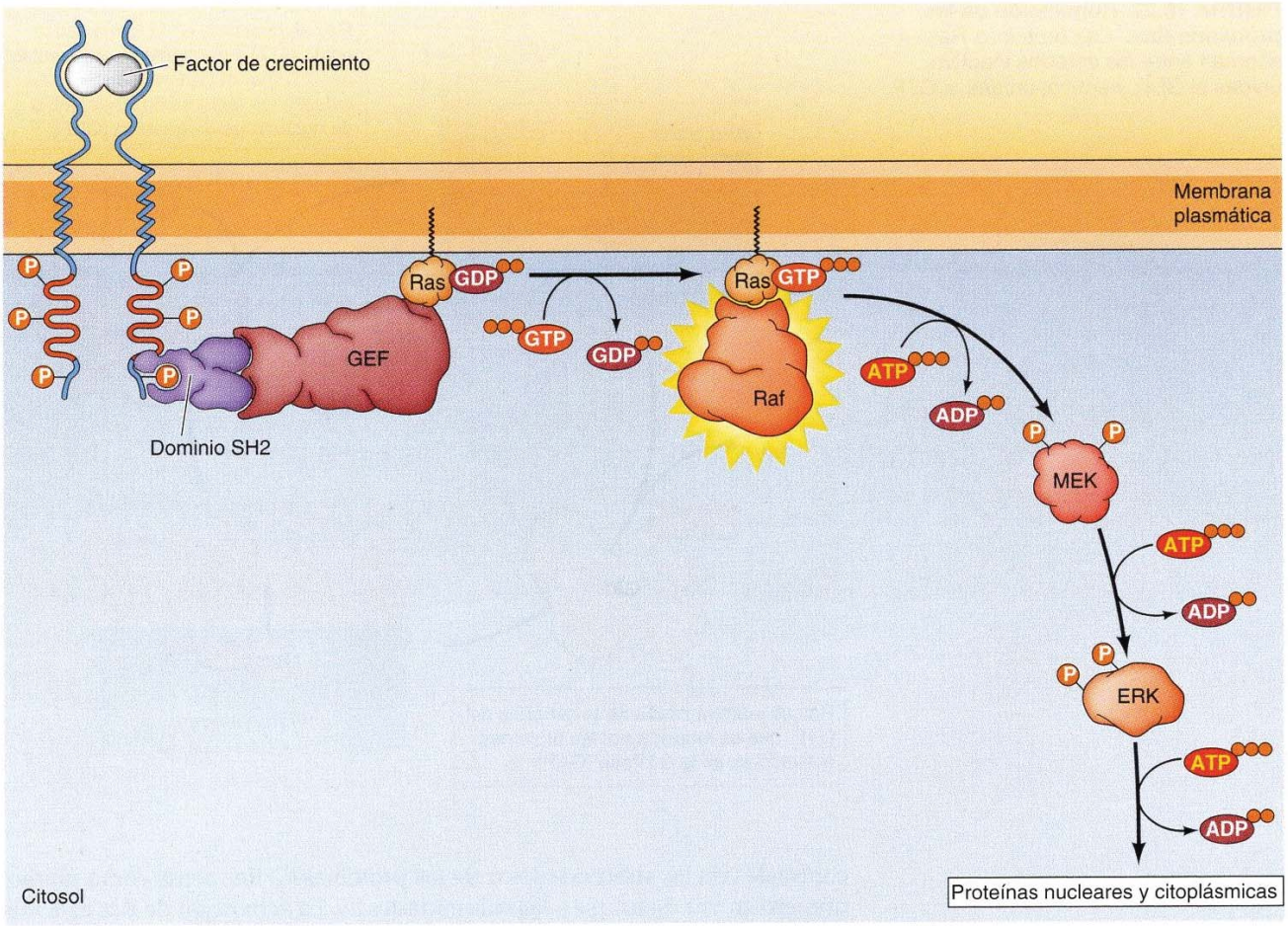


FIGURA 16.28 Activación de Ras, Raf y ERK con posterioridad a los receptores tirosina quinasas. El factor de crecimiento que se une a un receptor tirosina quinasa produce autofosforilación y formación de sitios de unión para el dominio SH2 de un factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF). Esta interacción recluta el GEF en la membrana plasmática donde puede estimular el intercambio en Ras de GDP/GTP. El complejo Ras-GTP activado se une a continuación a la proteína quinasa Raf, lo cual lleva a la activación de Raf. La Raf fosforila y activa la MEK, una proteína quinasa de especificidad dual que activa la ERK por fosforilación en los residuos de treonina y de tirosina (treonina-183 y tirosina-185). Después, la ERK fosforila diversas proteínas diana nucleares y citoplásmicas.

vez activada, la ERK fosforila diversas proteínas diana, entre ellas otras proteína quinasas y factores de transcripción.

Una fracción de la ERK activada se transloca al núcleo donde regula factores de transcripción por fosforilación (**Fig. 16.29**). A este respecto debe reseñarse que una respuesta primaria a la estimulación de factores de crecimiento es la rápida inducción transcripcional de una familia de aproximadamente 100 genes denominados **genes tempranos inmediatos.** La inducción de muchos genes tempranos inmediatos está mediada por una secuencia reguladora que se conoce como **elemento de respuesta al suero (SRE),** reconocida a su vez por un complejo de factores de transcripción que incluye el **factor de respuesta al suero (SRF)** y **Elk-1**. La ERK fosforila y activa Elk-1 y proporciona un enlace directo entre la familia ERK de quinasas MAP y la inducción de genes tempranos inmediatos. Muchos genes tempranos inmediatos codifican a su vez factores de transcripción, con lo que su inducción en la respuesta a la estimulación del factor de crecimiento conduce a una expresión alterada de una batería de otros genes corriente abajo llamados **genes de respuesta secundaria.** Como se indica en el

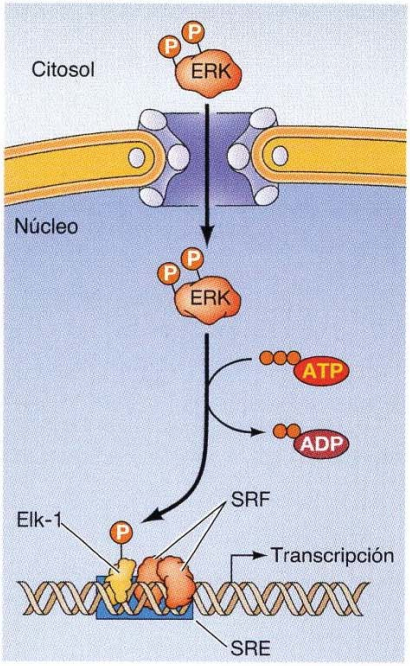


FIGURA 16.29 Inducción de los genes tempranos inmediatos por ERK. La ERK activada se transloca al núcleo, donde fosforila al factor de transcripción Elk-1. Elk-1 se une al elemento de respuesta al suero (SRE) formando un complejo con el factor de respuesta al suero (SRF). La fosforilación estimula la actividad de Elk-1 como activador de la transcripción, induciendo a los genes tempranos inmediatos.

Capítulo 17, estas alteraciones en la expresión génica relacionan directamente la señalización de ERK con la estimulación de la proliferación celular inducida por los factores de crecimiento.

Tanto las levaduras como las células de mamífero tienen múltiples vías de quinasas MAP que controlan respuestas celulares distintas. Cada cascada está constituida por tres proteína quinasas: una quinasa MAP terminal y dos quinasas anteriores (análogas a Raf y MEK) que regulan su actividad. En la levadura *S. cerevisiae*, son cinco las cascadas diferentes de quinasas MAP que regulan el apareamiento, la esporulación, la generación de filamentos, el remodelado de la pared celular y la respuesta a una elevada osmolaridad. En las células de mamíferos se han identificado tres grupos principales de quinasas MAP. Además de los miembros de la familia ERK, se diferencian las quinasas MAP JNK y p38 que se activan preferentemente en respuesta a las citoquinas inflamatorias y al estrés celular (p. ej., la radiación ultravioleta) (**Fig. 16.30**). Las cascadas de JNK y quinasa MAP p38 son activadas por acción de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP de la subfamilia Rho (incluidas Rac, Rho y Cdc42) en lugar de por Ras. Mientras que la señalización por ERK conduce principalmente a la supervivencia, diferenciación o proliferación celular, las vías de las quinasas MAP JNK y p38 llevan a la inflamación y a la muerte celular. Al igual que ERK, las MAP quinasas JNK y p38 pueden translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción que regulan la expresión génica. Por tanto, en todos los tipos de células eucariotas actúan múltiples vías de quinasas MAP que controlan las respuestas celulares a las diversas señales ambientales.

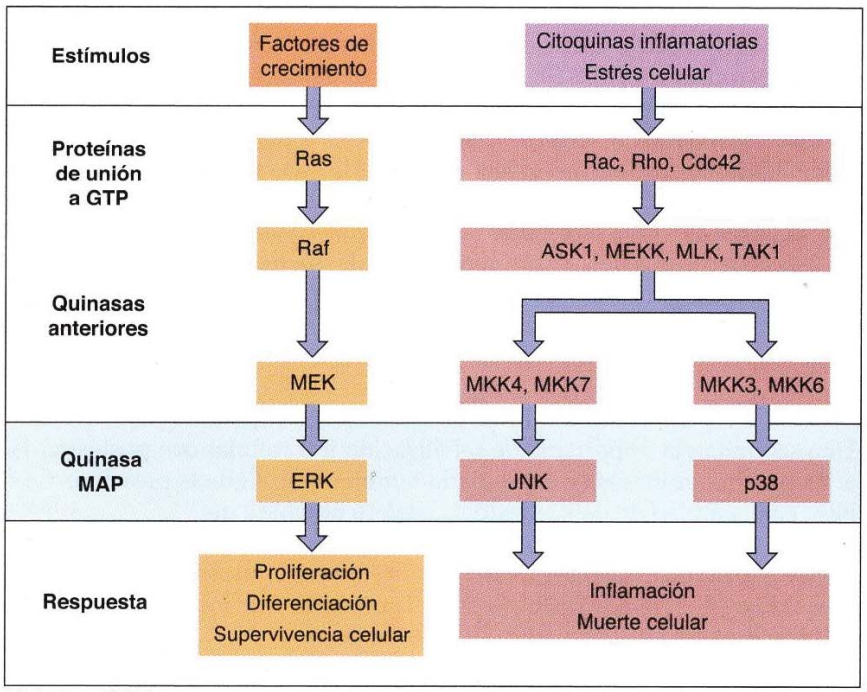


FIGURA 16.30 Vías de activación de las quinasas MAP en las células de mamíferos. Además de ERK, las células de mamíferos poseen las quinasas MAP JNK y p38. La activación de JNK y de p38 está mediada por miembros de la subfamilia Rho de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP (Rac, Rho y Cdc42), que estimula las cascadas de proteína quinasas paralelas a las responsables de la activación de ERK. Las cascadas de proteína quinasas que conducen a la activación de JNK y p38 parece que son activadas preferentemente por las citoquinas y el estrés celular, y conducen, en general, a la inflamación o a la muerte celular.

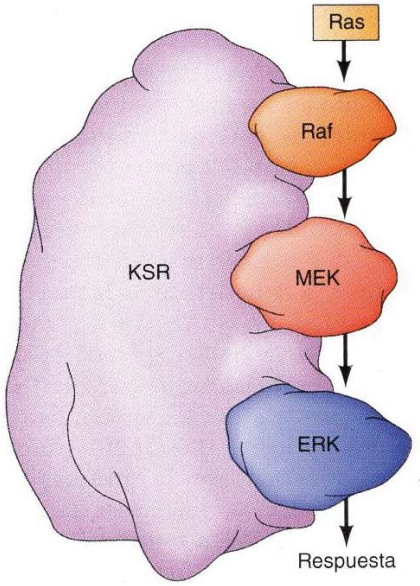


FIGURA 16.31 Una proteína *scaffold* para la cascada de ERK y quinasa MAP. La proteína *scaffold* KSR se une a Raf, MEK y ERK, y organiza estos componentes de la vía de ERK y quinasa MAP en un complejo de señalización.

La especificidad de la señalización de las MAP quinasas se mantiene, al menos en parte, gracias a la organización de los componentes de cada cascada de MAP quinasas en complejos que están asociados con **proteínas *scaffold*** (andamio, en inglés), que organizan complejos de moléculas señalizadoras. Por ejemplo, la proteína *scaffold* KSR organiza a la ERK y sus factores activadores situados corriente arriba Raf y MEK en un complejo de señalización (**Fig. 16.31**). Como resultado de la asociación específica de estas proteínas quinasa sobre KSR, la activación de Raf por parte de Rac da lugar a la activación específica y eficaz de MEK, que a su vez activa a ERK. Tras la fosforilación de MEK, ERK se disocia de KSR y puede translocarse al núcleo. Diferentes proteínas *scaffold* están implicadas no sólo en la organización de otros complejos de señalización de MAP quinasas, sino también en la asociación de otras moléculas señalizadoras con sus receptores y dianas. La asociación física de los componentes de la vía de señalización, como resultado de la interacción con las proteínas *scaffold*, se cree que desempeña un papel importante en la determinación de la especificidad de las vías de señalización en el interior celular.

Vías de PI 3-quinasa/Akt y mTOR

Una segunda vía importante de señalización intracelular con posterioridad a las tirosina quinasas (y estimulada también por algunas proteínas G) se basa en el empleo de un segundo mensajero obtenido del **fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2)** de membrana. EL PIP_2 es un componente de la membrana plasmática, situado en la cara interna de la bicapa de fosfolípidos (véase Fig. 14.2). Puede fosforilarse en la posición 3 de inositol por la acción de la enzima **fosfatidilinositido (PI) 3-quinasa.**

La forma de PI 3-quinasa activada por las tirosina quinasas tiene dominios SH2 y es reclutada y activada por asociación con receptores tirosina quinasas (**Fig. 16.32**). Una isoforma alternativa de la PI 3-quinasa es activada por proteínas G. La fosforilación de PIP_2 produce el segundo mensajero **fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3)** que es fundamental para la señalización de la proliferación y la supervivencia de las células. Una diana clave del PIP3 es una serina/treonina quinasa denominada **Akt**. El PIP_3 se une a un dominio de Akt conocido como dominio de homología de pleckstrina (PH). Esta interacción recluta Akt en la cara interna de la membrana plas-

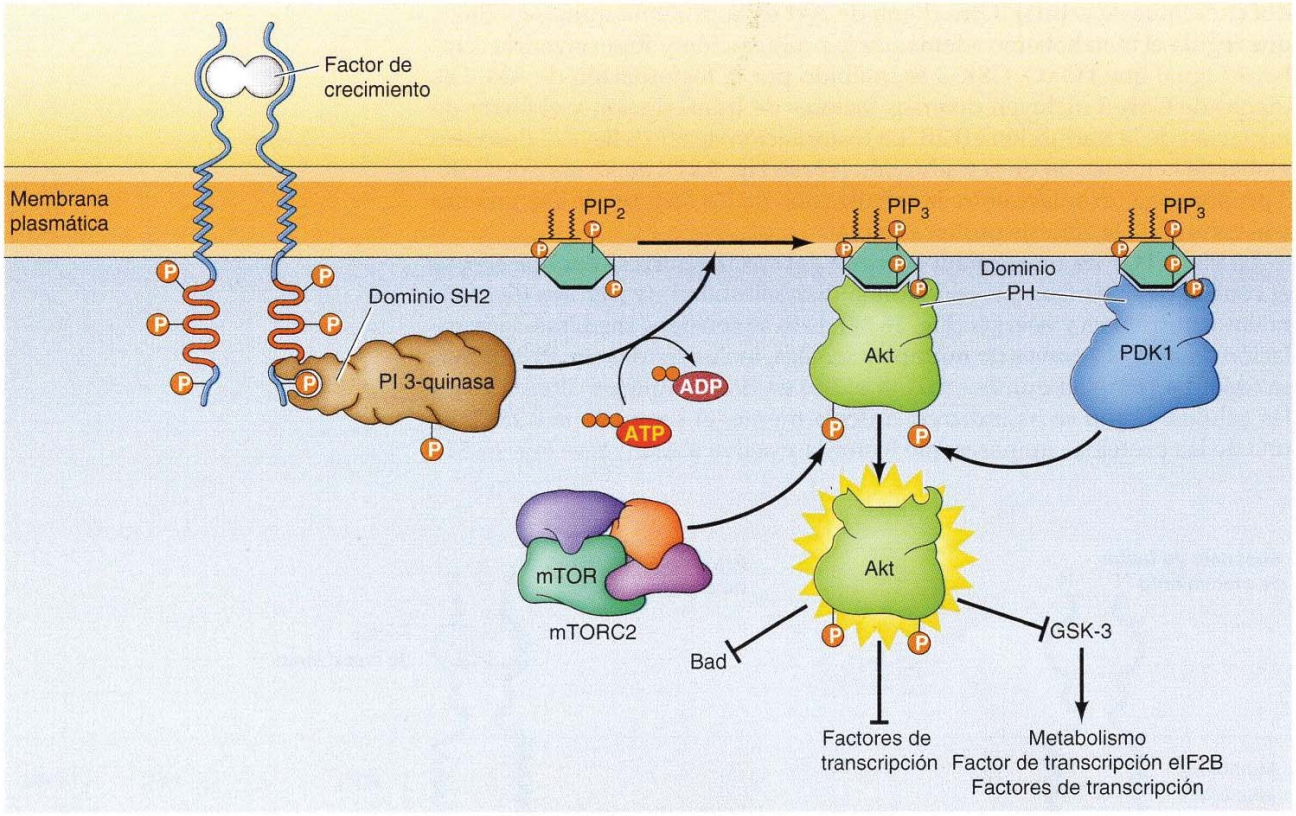


FIGURA 16.32 Vía de la PI 3-quinasa/Akt. La PI 3-quinasa es reclutada para activar los receptores tirosina quinasas a través de su dominio SH2. La PI 3-quinasa fosforila la posición 3 del inositol, con lo que convierte PIP_2 en PIP_3. La Akt es reclutada en la membrana plasmática por la unión a PIP_3 mediante su dominio de homología de pleckstrina (PH). Después se activa como consecuencia de la fosforilación por otra proteína quinasa (PDK1) que se une también a PIP3, así como por mTOR en el complejo mTORC2. Seguidamente, la Akt fosforila diversas proteínas diana, entre ellas reguladores directos de la supervivencia celular (como Bad, véase el Capítulo 18), varios factores de transcripción y otras proteína quinasas, entre ellas GSK-3 (que es inhibida por la fosforilación de Akt). La GSK-3 fosforila enzimas metabólicas, el factor de inicio de traducción eIF2B y factores de transcripción.

mática, donde es fosforilada y activada por otra proteína quinasa (llamada PDK1) que contiene también un dominio PH y se une a PIP_3. La formación de PIP_3 produce así la asociación de Akt y PDK1 con la membrana plasmática, lo que lleva a la fosforilación y activación de Akt. La activación de Akt requiere asimismo la fosforilación en un segundo punto por una proteína quinasa (mTORC2) diferente, que también es estimulada por factores de crecimiento.

Una vez activada, la Akt fosforila diversas proteínas diana, entre ellas proteínas que son reguladores directos de la supervivencia celular (como Bad, abordada en el Capítulo 18), factores de transcripción y otras proteína quinasas. Entre los factores de transcripción fundamentales a los que se dirige la Akt se incluyen miembros de la familia FOXO (**Fig. 16.33**). La fosforilación de FOXO por Akt crea un sitio de unión para las chaperonas citosólicas (proteínas 14-3-3) que secuestran a FOXO en una forma inactiva en el citoplasma. En ausencia de la señalización por factores de crecimiento y de actividad de Akt, FOXO es liberado de 14-3-3 y se transloca al núcleo, estimulando la transcripción de genes que inhiben la proliferación celular o in-

ducen la muerte celular. Otra diana de Akt es la proteína quinasa GSK-3, que regula el metabolismo además de la proliferación y supervivencia celular. Al igual que FOXO, GSK-3 es inhibido por la fosforilación de Akt. Las dianas de GSK-3 incluyen diversos factores de transcripción y el factor de iniciación de la traducción eIF2B. La fosforilación de eIF2B lleva al descenso global de la iniciación de la traducción (véase Fig. 9.21), de forma que GSK-3 proporciona un enlace entre la señalización de los factores de crecimiento y el control de la síntesis proteica celular.

La vía **mTOR** es un regulador central del crecimiento celular que acopla el control de la síntesis proteica con la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes y energía (**Fig. 16.34**). Esto se consigue mediante la regulación de mTOR a través de múltiples señales, incluyendo la vía PI 3-quinasa/Akt. La proteína quinasa mTOR existe en dos complejos diferentes en las células. Como se ha indicado anteriormente, el complejo mTORC2 es una de las proteínas quinasas que fosforila y activa a Akt (véase Fig. 16.32).

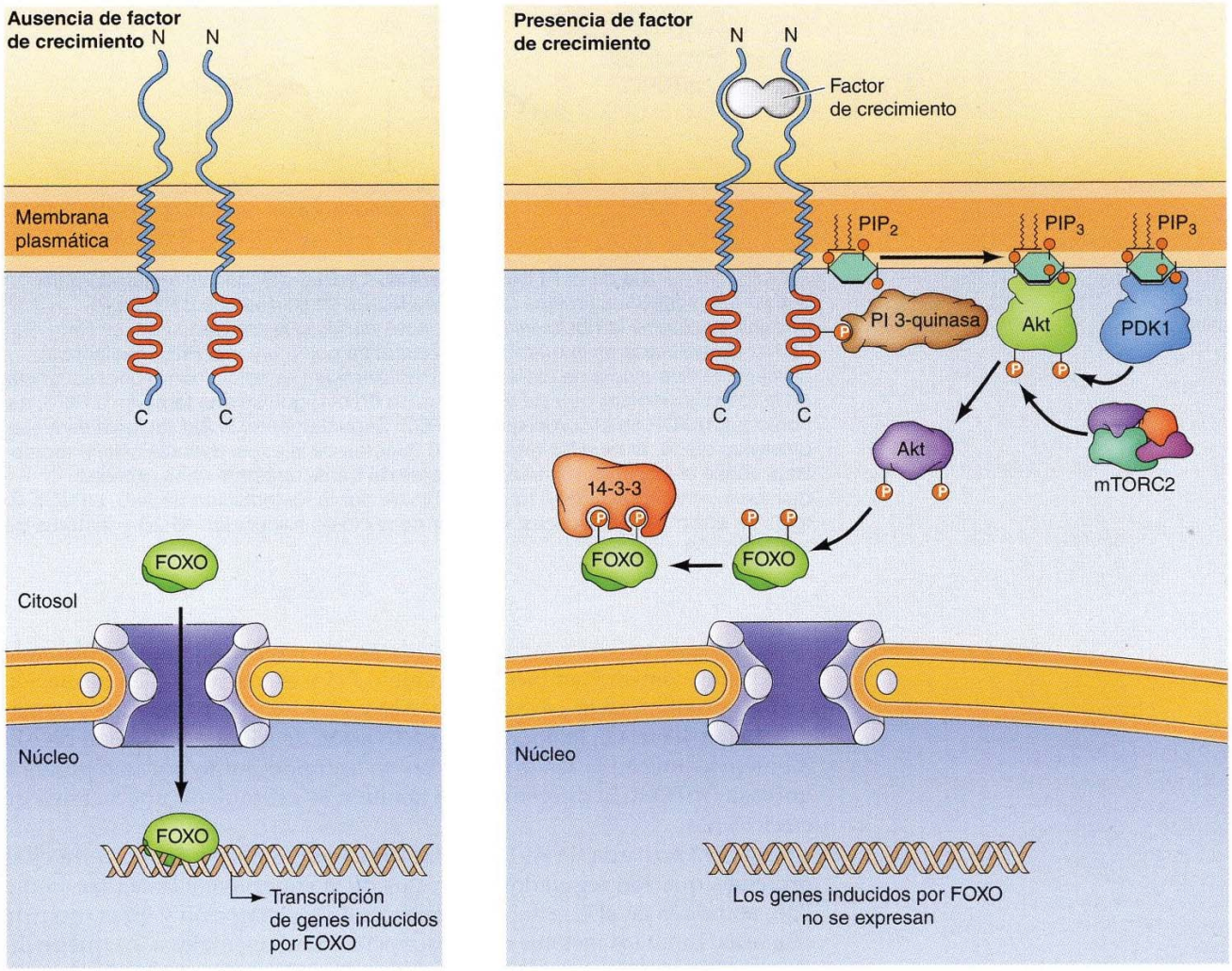


FIGURA 16.33 Regulación de FOXO. En ausencia de estimulación por factores de crecimiento, el factor de transcripción FOXO se transloca al núcleo e induce la expresión del gen diana. La estimulación por factores de crecimiento da lugar a la activación de Akt, que fosforila a FOXO. Esto crea sitios de unión para la chaperona citosólica 14-3-3, que secuestra a FOXO en una forma inactiva en el citoplasma.

Por el contrario, el complejo mTORC1 es activado corriente abajo de Akt y funciona para regular el tamaño celular, al menos en parte mediante el control de la síntesis proteica. El complejo mTORC1 está regulado por las proteínas de unión a GTP relacionada con Ras Rheb, que a su vez es regulada por el complejo proteico activador de GTPasa TSC1/2. Akt fosforila e inhibe la actividad de TSC1/2, lo que provoca la activación de mTORC1 como respuesta. Adicionalmente, TSC1/2 está regulado por otra proteína quinasa denominada la quinasa activada por AMP (AMPK). La AMPK detecta el estado energético de la célula y es activada por una elevada proporción de

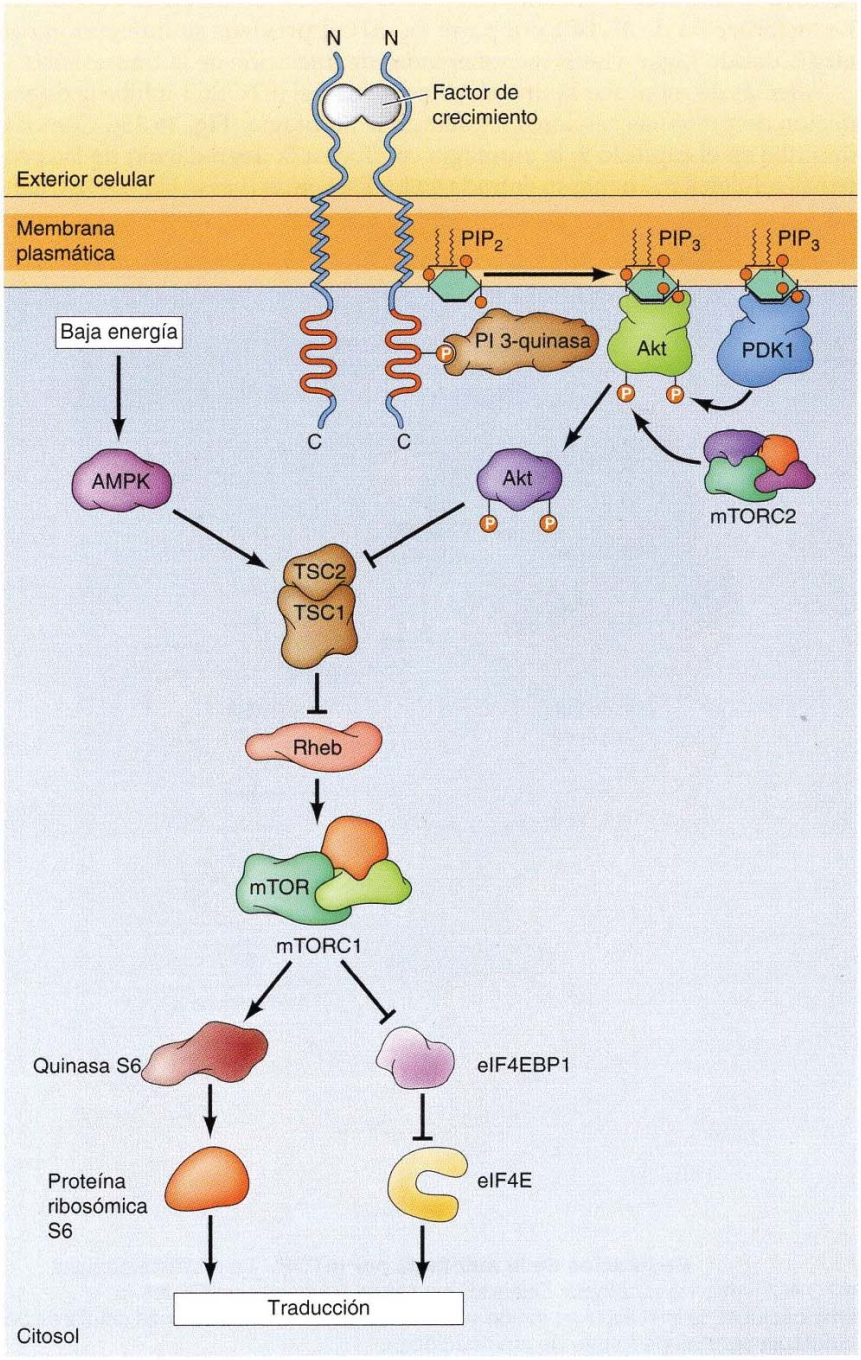


FIGURA 16.34 La vía mTOR. La Akt inhibe el complejo TSC1/2, lo que conduce a la activación de Rheb y mTORC1 en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento. Por el contrario, AMPK activa el complejo TSC1/2, dando lugar a la inhibición de Rheb y mTORC1 si las reservas de energía celular están agotadas. mTORC1 estimula la traducción mediante la fosforilación de la quinasa S6 (que fosforila la proteína ribosómica S6) y mediante la fosforilación de la proteína de unión a eIF4E, eliminando la inhibición del factor de iniciación de la traducción eIF4E.

AMP frente a ATP. Bajo estas condiciones, AMPK fosforila y activa TSC1/2, dando lugar a la inhibición de mTORC1 cuando las reservas energéticas celulares están vacías. TSC1/2 a su vez es regulada por la disponibilidad de aminoácidos, necesarios para su actividad.

El complejo mTORC1 fosforila al menos a dos dianas bien caracterizadas que funcionan para regular la síntesis proteica: la quinasa S6 y la proteína 1 de unión a eIF4E (4E-BP1). La quinasa S6 controla la traducción mediante la fosforilación de la proteína ribosómica S6 además de otras proteínas implicadas en la regulación de la traducción. La proteína de unión a eIF4E controla la traducción mediante su interacción con el factor de iniciación eIF4E, que se une a la caperuza 5′ del ARNm (véase Fig. 9.22). En ausencia de señalización por parte de mTOR, las 4E-BP no fosforiladas se unen a eIF4E e inhiben la traducción interfiriendo con la interacción de eIF4E con eIF4G. La fosforilación de 4E-BP1 por parte de mTOR previene su interacción con eIF4E, dando lugar a tasas incrementadas de iniciación de la traducción.

Además de estimular la síntesis de proteínas, el mTORC1 inhibe la degradación de proteínas celulares regulando la autofagia (**Fig. 16.35**). Como se describe en el capítulo 9, la autofagia conduce a la degradación de las proteínas celulares mediante su entrada en los lisosomas (véase Fig. 9.48). Cuan-

◆ La rapamicina, un antibiótico producido por una bacteria, es un inhibidor específico del complejo mTORC1 y es empleado como medicamento inmunosupresor en los trasplantes de órganos.

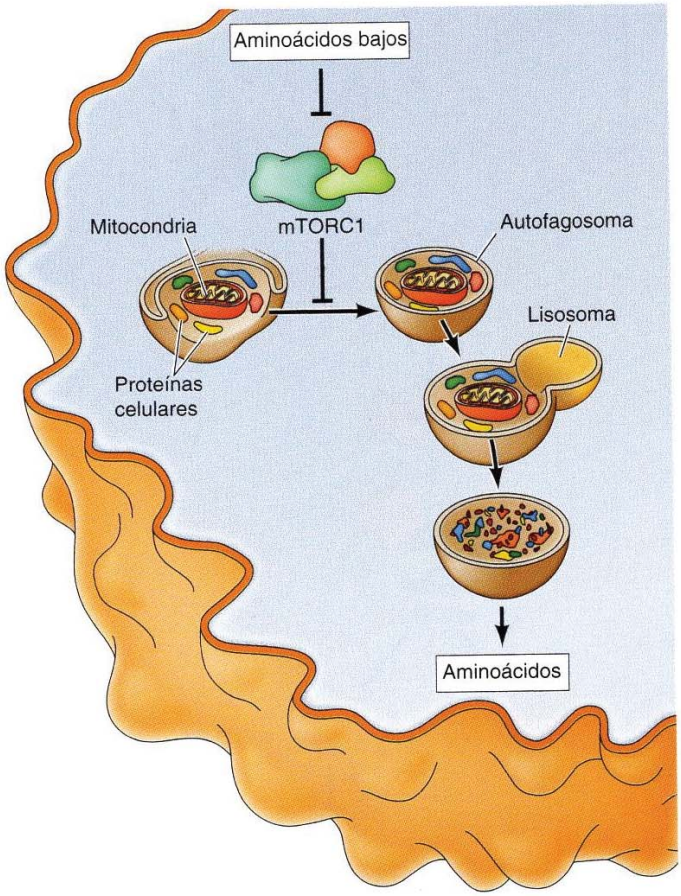


FIGURA 16.35 Regulación de la autofagia por mTOR. La proteína quinasa mTORC1 inhibe la autofagia. Cuando una célula agota sus nutrientes (p. ej., aminoácidos), la mTORC1 se inhibe y la degradación de las proteínas celulares por autofagia aporta una fuente de aminoácidos.

do las células carecen de nutrientes (p. ej., aminoácidos), la actividad de mTORC1 disminuye, estimulándose así la autofagia y permitiendo que las células degraden proteínas no esenciales para reutilizar sus aminoácidos.

Fosfolípidos C y Ca^{2+}

Otra vía importante de señalización intracelular, activada con posterioridad a los receptores acoplados a tirosina quinasas y proteínas G, se basa en la hidrólisis de PIP2 por **fosfolipasa C (PLC)**, una reacción que produce dos segundos mensajeros diferentes, **diacilglicerol (DAG)** e **inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3)** (**Fig. 16.36**). La forma de fosfolipasa C (PLC-γ) activada con posterioridad a las tirosina quinasas contiene dominios SH2 que median en su asociación con receptores tirosina quinasas activados. Esta interacción localiza la PLC-γ en la membrana plasmática y conduce a la fosforilación de tirosina, lo que incrementa su actividad catalítica. DAG e IP_3 estimulan a continuación diferentes vías de señalización corriente abajo (proteína quinasa C y movilización de Ca^{2+}, respectivamente), con lo que la hidrólisis de PIP_2 activa una cascada de señalización intracelular de dos brazos.

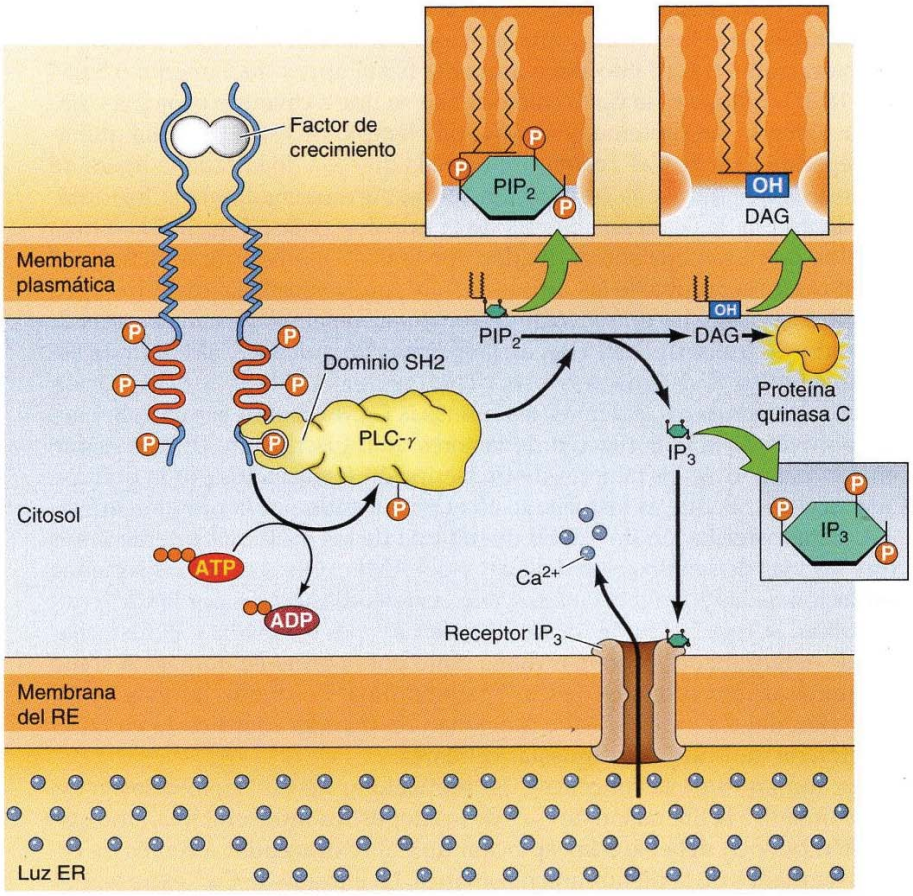


FIGURA 16.36 Activación de fosfolipasa C por tirosina quinasas. La fosfolipasa C-γ (PLC-γ) se une a sus receptores tirosina quinasas activados por medio de sus dominios SH2. La fosforilación de tirosina aumenta la actividad de PLC-γ, estimulando la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e inositol trisfosfato (IP_3). La DAG activa los miembros de la familia de las proteína quinasas C. IP_3 se une a receptores que son canales de Ca^{2+} activados por ligando en la membrana del retículo endoplásmico. La apertura de estos canales permite el flujo de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico al citosol.

El diacilglicerol producido por la hidrólisis de PIP_2 permanece asociado a la membrana plasmática y activa las proteína-serina/treonina quinasas pertenecientes a la familia de la **proteína quinasa C**, muchas de las cuales juegan papeles importantes en el control del crecimiento y diferenciación celular. El otro segundo mensajero producido por la escisión de PIP_2, IP_3, es una pequeña molécula polar que es liberada al citosol, donde actúa señalizando la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. Como se señaló en el Capítulo 14, la concentración de Ca^{2+} se mantiene en niveles extremadamente bajos (aprox. 0,1 μM) debido a la acción de las bombas de Ca^{2+} que expulsan el Ca^{2+} del interior celular por transporte activo. El Ca^{2+} no sólo se bombea a través de la membrana plasmática, sino también al retículo endoplásmico, sirviendo así, éste, como un reservorio intracelular de Ca^{2+}. El IP_3 libera el Ca^{2+} del retículo endoplásmico mediante su unión a receptores que son canales de Ca^{2+} regulados por ligando. Debido a esto, los niveles de Ca^{2+} citosólico aumentan hasta cerca de 1 µM, lo que afecta a la actividad de diversas proteínas diana, incluyendo proteína quinasas y fosfatasas. Por ejemplo, algunos miembros de la familia de la proteína quinasa C requieren Ca^{2+} así como diacilglicerol para su activación, por lo que estas proteína quinasas son reguladas por ambas ramas de la vía de señalización del PIP_2. Una de las principales proteínas de unión a Ca^{2+} que media en los efectos de este catión es la **calmodulina**, que se activa por la unión del Ca^{2+} cuando la concentración del Ca^{2+} citosólico aumenta hasta aproximadamente 0,5 µM (**Fig. 16.37**). Entonces, la Ca^{2+}/calmodulina se une a diversas proteínas diana, incluyendo las proteína quinasas. Un ejemplo de estas proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina es la quinasa de la cadena ligera de la miosina, que induce la contracción actina-miosina mediante la fosforilación de una de las cadenas ligeras de la miosina (véase Fig. 13.31). Otras proteína quinasas que son activadas por la Ca^{2+}/calmodulina incluyen a miembros de la familia de las **quinasas CaM**, que fosforilan a distintos tipos de proteínas, entre las que se incluyen enzimas metabólicas, canales iónicos y factores de transcripción. Una de las formas de quinasa CaM abunda especialmente en el sistema nervioso, donde regula la síntesis y la liberación de neurotransmisores. Además, las quinasas CaM regulan la expresión génica a través de la fosforilación de factores de transcripción. Es interesante señalar que uno de los factores de transcripción fosforilados por la quinasa CaM es el CREB, que es fosforilado en el mismo sitio por la proteína quinasa A. Esta fosforilación del CREB ilustra una de las múltiples interacciones entre las vías de señalización del Ca^{2+} y del AMPc. Otros ejemplos serían la regulación de las adenilato ciclasas y de las fosfodiesterasas por la Ca^{2+}/calmodulina, la regulación de los canales de Ca^{2+} por el AMPc, y la fosforilación de determinadas proteínas diana tanto por la proteína quinasa A como por quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina. Por tanto, las vías de señalización del Ca^{2+} y del AMPc funcionan de manera coordinada en la regulación de multitud de respuestas celulares.

Los aumentos de la concentración intracelular de Ca^{2+} no obedecen exclusivamente a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, sino que también pueden deberse a la captación de Ca^{2+} extracelular a través de canales regulados de la membrana plasmática. La entrada de Ca^{2+} extracelular es particularmente importante en las células nerviosas y musculares eléctricamente excitables, en las que los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de la membrana plasmática se abren debido a la despolarización de la membrana (**Fig. 16.38**). El incremento de Ca^{2+} resultante dispara, a su vez, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, mediante la activación de canales de Ca^{2+} diferentes denominados **receptores de rianodina**. En las neuronas, uno de los efectos del aumento del Ca^{2+} intracelular es activar la liberación de los neurotransmisores, por lo que el Ca^{2+} desempeña un papel fundamental

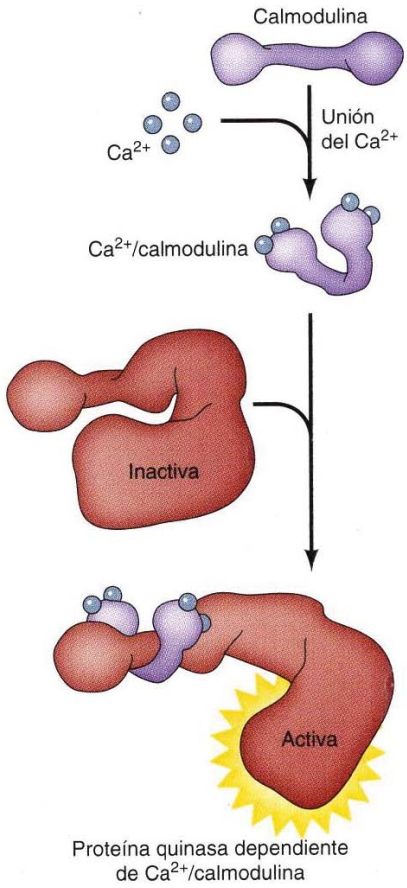


FIGURA 16.37 Función de la calmodulina. La calmodulina es una proteína con forma de mancuerna, con cuatro sitios de unión al Ca^{2+}. El complejo activo Ca^{2+}/calmodulina se une a diversas proteínas diana, incluyendo a proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina.

◆ Los venenos tóxicos procedentes de serpientes contienen fosfolipasas. La hidrólisis de fosfolípidos por el veneno procedente de la serpiente cascabel y de la cobra dan lugar a la rotura de las membranas de los glóbulos rojos.

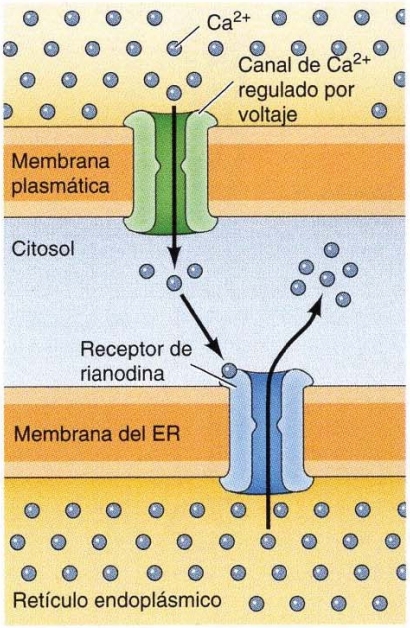


FIGURA 16.38 Regulación del Ca^{2+} intracelular en las células eléctricamente excitables. La despolarización de la membrana provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de la membrana plasmática, lo que supone el flujo de Ca^{2+} desde el fluido extracelular. El incremento de Ca^{2+} intracelular resultante activa la ulterior liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares mediante la apertura de otros canales de Ca^{2+} diferentes (receptores de rianodina) en la membrana del retículo endoplásmico. En las células musculares, la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico puede tener lugar directamente, en respuesta a la despolarización de la membrana.

en la conversión de señales eléctricas a señales químicas en el sistema nervioso. En las células musculares, el Ca^{2+} se acumula en el retículo sarcoplásmico, de donde se libera a partir de la apertura de los receptores de rianodina en respuesta a la variación en el potencial de membrana. La liberación del Ca^{2+} acumulado supone un gran incremento del Ca^{2+} citosólico, lo que dispara la contracción muscular (véase Fig. 13.28). Por tanto, las células utilizan diversos mecanismos para regular los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo que hace del Ca^{2+} un segundo mensajero muy versátil que controla un amplio rango de procesos celulares.

Receptores acoplados a factores de transcripción

Las vías de AMPc, quinasa MAP y PI 3-quinasa son ejemplos de conexiones indirectas entre la superficie celular y el núcleo en las que una cascada de segundos mensajeros y proteína quinasas termina por conducir a una fosforilación de factores de transcripción. Otros tipos de receptores de factores de crecimiento (abordados en esta sección) están relacionados de forma más directa con factores de transcripción que tienen cometidos importantes en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células.

Vía TGF-β/Smad

La vía TGF-β/Smad es similar a la señalización JAK/STAT (véase Fig. 16.25) en el hecho de que una proteína quinasa asociada con un receptor fosforila y activa directamente un factor de transcripción. Sin embargo, los receptores para el **factor de crecimiento transformante β (TGF-β)** y otros polipéptidos relacionados, son proteína quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina de sus proteínas sustrato, en vez de restos de tirosina. El TGF-β es el prototipo de una familia de factores de crecimiento polipeptídicos que controlan la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares de una variedad de tipos celulares. La clonación del primer receptor para un miembro de la familia TGF-β en 1991 reveló que es el prototipo de una familia especial de receptores con un dominio de serina/treonina quinasas citosólico. Desde entonces se han encontrado otros receptores para miembros adicionales de la familia TGF-β que son serina/treonina quinasas.

Los receptores TGF-β están compuestos por dos polipéptidos distintos (designados como polipéptidos tipo I y tipo II, que se asocian después de la unión a ligandos (**Fig. 16.39**). Los receptores están compuestos por polipéptidos de tipo I y II, que se asocian después de la unión del ligando. El receptor de tipo II a continuación fosforila al receptor de tipo I, que a su vez fos-

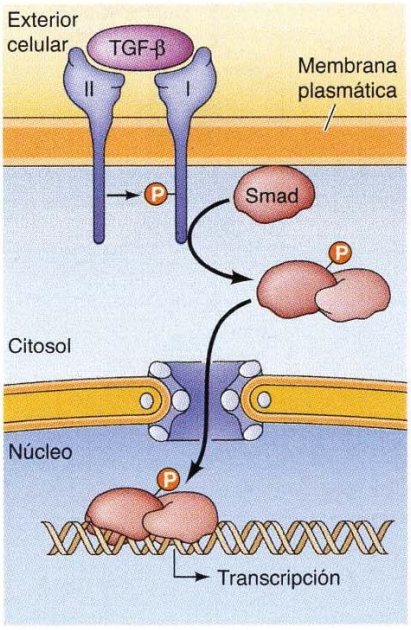


FIGURA 16.39 Señalización desde receptores de TGF-β. Los receptores de TGF-β son dímeros de polipéptidos de tipo I y II. El receptor de tipo II fosforila y activa al tipo I, que a su vez fosforila a una proteína Smad. Las Smad fosforiladas forman complejos y se translocan al núcleo para la transcripción de los genes diana.

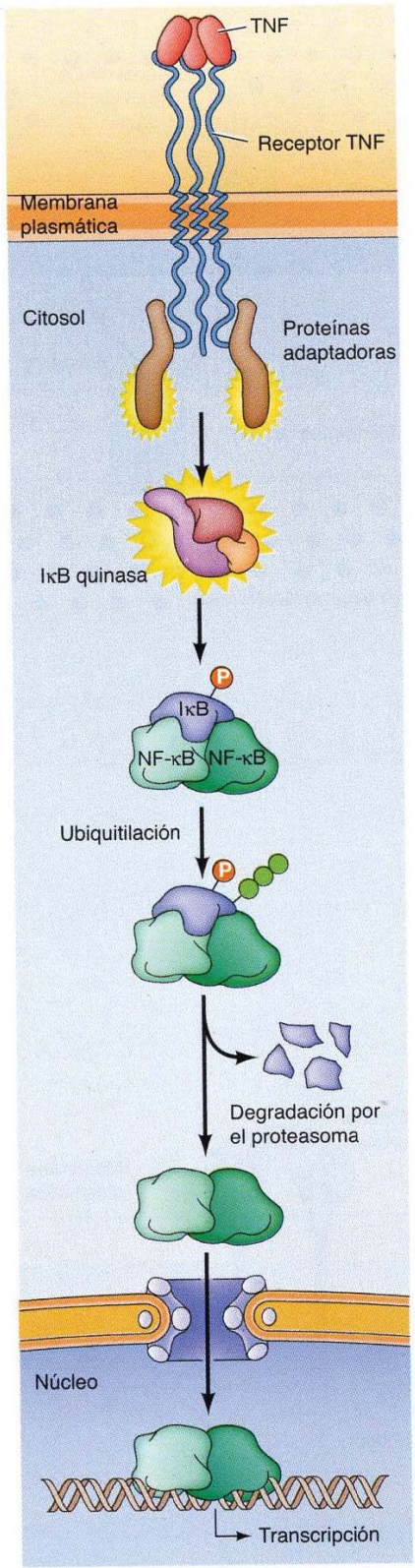


FIGURA 16.40 Señalización de NF-κB desde el receptor de TNF. En su estado inactivo, homo- y heterodímeros de NF-κB pueden encontrarse unidos a IκB en el citoplasma. La activación del receptor de TNF (formado por tres cadenas polipeptídicas) induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan la IκB quinasa. Esta fosforilación marca a IκB para su ubiquitilación y degradación por el proteasoma, permitiendo que NF-κB se transloque al núcleo y active la transcripción de sus genes diana.

forila factores de transcripción de la familia **Smad**. Las Smad fosforiladas forman complejos y se translocan al núcleo y estimula la expresión de genes diana. Debería tenerse en cuenta que existen al menos 30 miembros diferentes de la familia TGF-β en el hombre, que generan diferentes respuestas en sus células diana. Esto se consigue mediante las interacciones combinatorias de siete receptores de tipo I diferentes y cinco receptores de tipo II, que generan la activación de diferentes miembros de la familia Smad (un total de ocho miembros).

Señalización vía NF-κB

La señalización vía NF-κB es otro ejemplo de una vía de señalización, que tiene como diana una familia específica de factores de transcripción, en este caso por estimulación de la ubiquitilación y la degradación de una subunidad inhibidora. La familia **NF-κB** consiste en cinco factores de transcripción que juegan papeles clave en el sistema inmune y en la inflamación, además de en la regulación de la proliferación y supervivencia de múltiples tipos de células animales. Miembros de esta familia de factores de transcripción se activan en respuesta a una diversidad de estímulos, incluidos citoquinas, factores de crecimiento, bacterianas e infección viral y lesiones del ADN.

Se conocen muy bien las rutas de señalización que producen la activación de NF-κB a partir del receptor del **factor de necrosis tumoral** (una citoquina que induce procesos de inflamación y muerte celular) y de los **receptores tipo Toll**, los cuales reconocen diversas moléculas asociadas a bacterias y virus patógenos. En células sin estimular las proteínas NF-κB se encuentran unidas a proteínas inhibitorias **IκB** que mantienen a las NF-κB en estado inactivo en el citosol (**Fig. 16.40**). La activación de los receptores del TNF y los receptores tipo Toll inducen el reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan la IκB quinasa, que a su vez fosforila a IκB. Esta fosforilación dirige a IκB hacia su ubiquitilación y degradación por el proteasoma, liberando a NF-κB para translocarse al núcleo e inducir la expresión de sus genes diana.

Vías Hedgehog, Wnt y Notch

Las vías **Hedgehog** y **Wnt** son sistemas de señalización estrechamente conectadas, que activan los factores de transcripción inhibiendo su ubiquitilación y degradación. Ambas vías, Hedgehog y Wnt, fueron descritas en primer lugar en *Drosophila*, pero se ha visto que miembros de ambas familias controlan una amplia gama de eventos durante el desarrollo tanto de embriones vertebrados como invertebrados. Ejemplos de procesos regulados por estas vías de señalización incluyen la determinación de tipos celulares y el establecimiento de patrones durante el desarrollo de miembros, el sistema nervioso, el esqueleto, pulmones, pelo, dientes y gónadas. Por otra parte, las vías Hedgehog y Wnt juegan unos papeles clave en la regulación de la proliferación de las células progenitoras en los tejidos adultos (véase Cap. 18).

Los genes *hedgehog* (uno en *Drosophila* y tres en mamíferos) codifican proteínas secretadas que son modificadas mediante la adición de lípidos y ac-

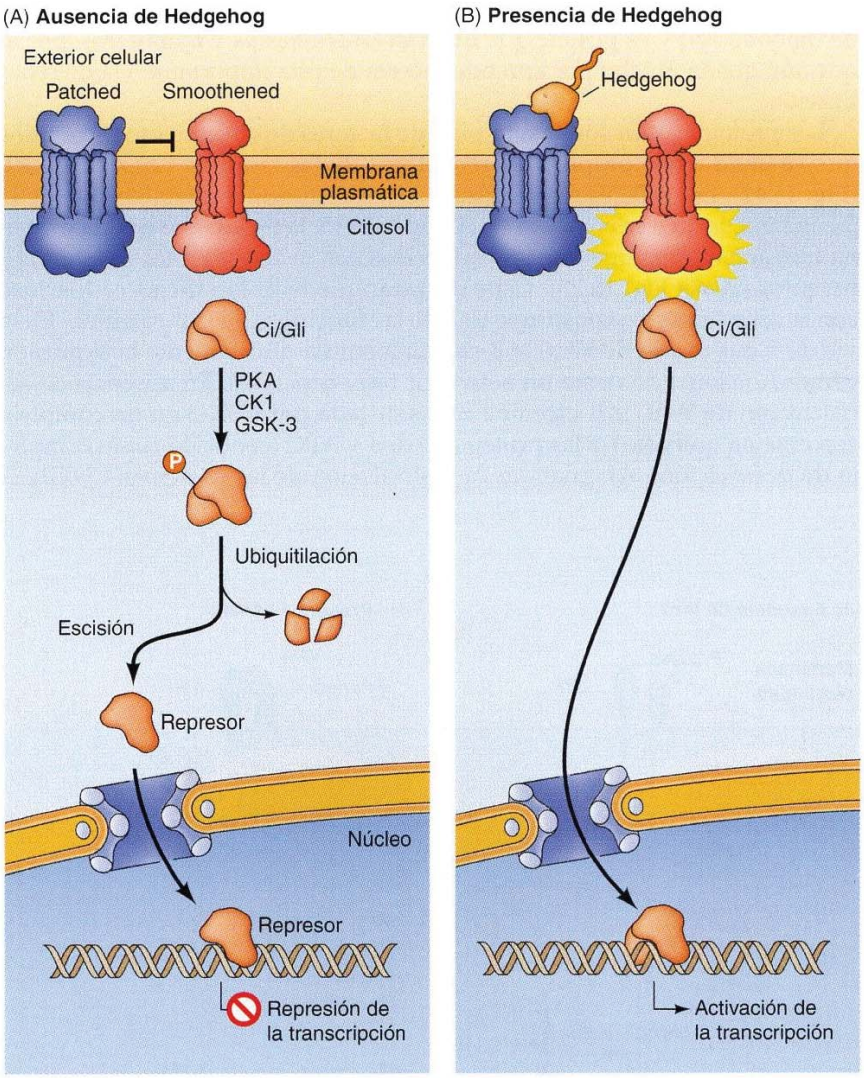


FIGURA 16.41 Señalización de Hedgehog. (A) En ausencia de su ligando, el receptor de Hedgehog (Patched) inhibe a Smoothened y los factores de transcripción Ci/Gli son fosforilados por la proteína quinasa A (PKA), la caseína quinasa-1 (CK1) y la quinasa-3 de la glicógeno sintasa (GSK-3). Las proteínas Ci/Gli fosforiladas se ubiquitilan para ser degradadas o escindidas en fragmentos de actividad represora. (B) La unión del polipéptido Hedgehog inhibe a Patched, lo que induce la activación de Smoothened. Este acontecimiento inhibe la fosforilación y la degradación de las proteínas Ci/Gli, que se translocan al núcleo y actúan como activadores transcripcionales de sus genes diana.

túan sobre células adyacentes. El receptor de Hedgehog es una proteína transmembrana (Patched) que inhibe a otra proteína transmembrana (Smoothened) (**Fig. 16.41**). La unión de Hedgehog inhibe el Patched, lo que da lugar a la activación de Smoothened, que a su vez pone en marcha una vía de señalización que activa un factor de transcripción denominado Ci en *Drosophila* y Gli en los mamíferos. Cuando Smoothened no está activada, una serie de proteína quinasas, como proteína quinasa A, caseína quinasa-1 y GSK-3, fosforilan a las proteínas Ci/Gli, que pueden degradarse o dar lugar a fragmentos que actuarán como represores. La vía de señalización de Smoothened inhibe la fosforilación y ulterior escisión de las proteínas Ci/Gli, que actúan como activadores de la transcripción. No obstante, no se

◆ Hedgehog fue identificado por primera vez en *Drosophila* y recibió su nombre por los embriones mutantes, que tenían cerdas pilosas semejantes a las púas de los puercoespines (*hedgehog*, en inglés).

conocen bien los acontecimientos moleculares que suceden corriente abajo de Smoothened y es posible que difieran en *Drosophila* y mamíferos, por lo que aún queda mucho por aprender acerca de esta importante vía de señalización.

Las proteínas Wnt son una familia de factores de crecimiento secretados que se unen a un complejo de receptores de las familias Frizzled y LRP (**Fig. 16.42**). Las señales de Frizzled y LRP producen la estabilización de la β-catenina, la cual se comentó en el Capítulo 15, la β-catenina es una proteína transmembrana que une las cadherinas con la actina en las uniones adherentes (véase Fig. 15.25). Cabe destacar que la unión de las cadherinas con la actina tan solo constituye una de las funciones de la β-catenina. En la vía de señalización de Wnt, la β-catenina regula directamente la expresión génica funcionando como un activador transcripcional. En ausencia de señalización de Wnt, la β-catenina es fosforilada por GSK-3 en un complejo con caseína quinasa-1 y las proteínas axina y APC (conocida como complejo de destrucción). Al igual que la fosforilación de las proteínas Ci/Gli, la

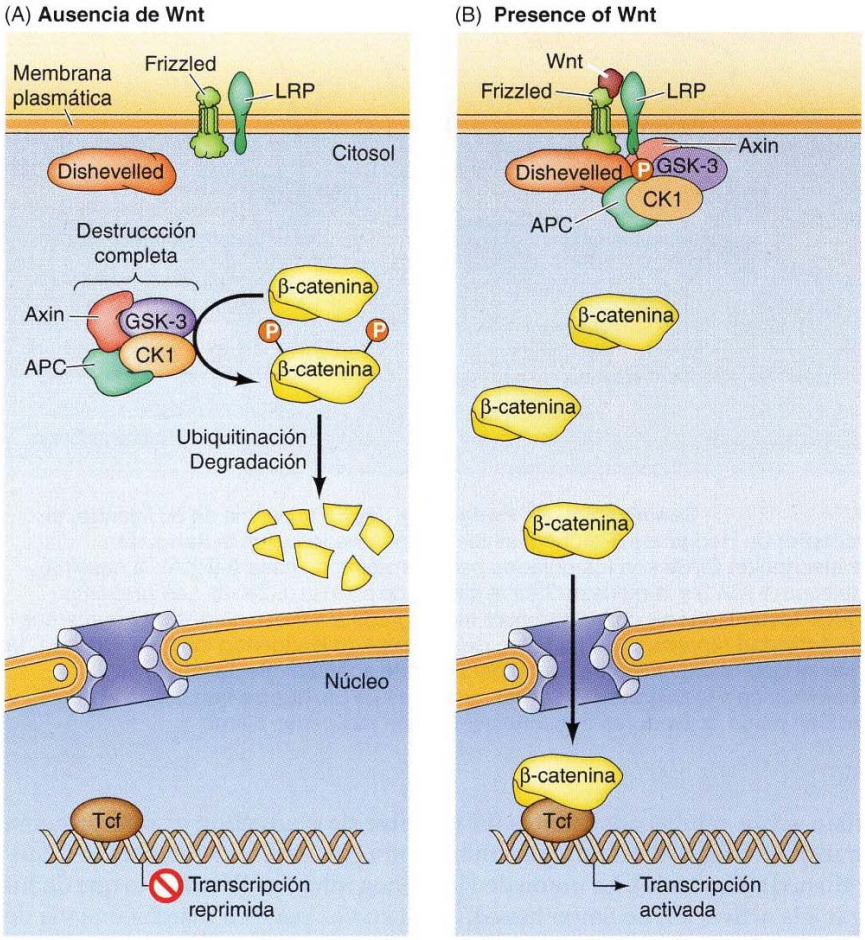


FIGURA 16.42 La vía de Wnt. (A) En ausencia de Wnt, la β-catenina es fosforilada por GSK-3 en un complejo con caseína quinasa-1, axina y APC (el complejo de destrucción), lo que conduce a la ubiquitilación y degradación de catenina. (B) Los polipéptidos Wnt se unen a los receptores Frizzled y LRP, para producir el reclutamiento de Dishevelled, β-catenina de inactivación. Después, la β-catenina se transloca al núcleo y forma un complejo con los factores de transcripción Tcf, convirtiéndose desde represores en activadores de sus genes diana.

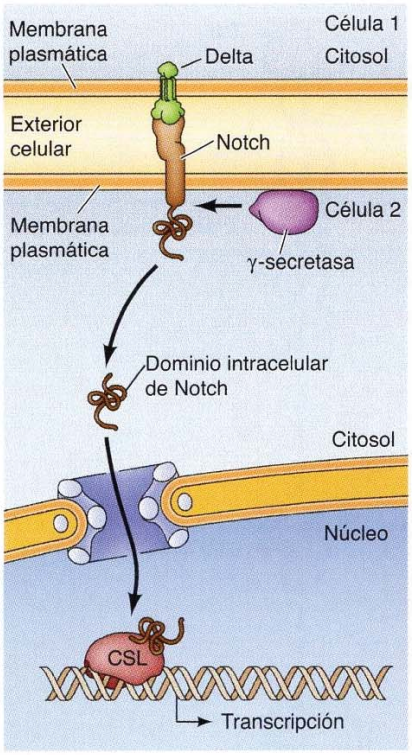


FIGURA 16.43 Señalización por Notch. Notch actúa como un receptor para la señalización directa célula-célula mediante proteínas transmembrana (por ejemplo, Delta) en la superficie de células vecinas. La unión de Delta desencadena la escisión proteolítica de Notch mediante la γ-secretasa. Esto libera el dominio intracelular de Notch, que se transloca al núcleo e interacciona con el factor de transcripción CSL para inducir la expresión génica.

fosforilación de β-catenina provoca su ubiquitilación y degradación. La unión de Wnt lleva a la asociación de Dishevelled (una proteína citoplásmica) con Frizzled, que después degrada el complejo de destrucción e inhibe la GSK-3, con lo que previene la degradación de β-catenina. Después, la β-catenina se transloca al núcleo y forma un complejo con la familia Tcf de factores de transcripción. En ausencia de β-catenina, estos factores ejercen una acción represora, mientras que al asociarse con esta molécula actúan como activadores que inducen la expresión de genes diana que codifican otras moléculas de señalización celular y diversos factores de transcripción que controlan el destino de la célula.

La vía **Notch** es otra vía de señalización altamente conservada que controla el destino celular durante el desarrollo animal. La señalización vía Notch es un ejemplo de interacciones directas célula-célula durante el desarrollo. Notch es una proteína grande con un solo dominio transmembrana que actúa como un receptor de señalización por proteínas transmembrana (por ejemplo, Delta) presentes en la superficie de células adyacentes (**Fig. 16.43**). La estimulación de Notch inicia una nueva vía directa de activación transcripcional. En particular, la unión del ligando desencadena la escisión proteolítica de Notch por parte de la γ-secretasa, y el dominio intracelular de Notch es entonces translocado al núcleo. El dominio intracelular de Notch interacciona a continuación con un factor de transcripción (denominado CSL en mamíferos) y le convierte de ser un represor en un activador de sus genes diana. Al igual que en la vía de señalización Wnt, los genes diana de Notch incluyen genes que codifican otras proteínas reguladoras de la transcripción, que actúan para determinar el destino celular.

Dinámica y redes de señalización

Hasta el momento se ha analizado la señalización en términos de vías rectilíneas que transmiten la información desde el ambiente hacia dianas intracelulares. Sin embargo, la señalización en el interior de la célula es mucho más complicada. En primer lugar, las actividades de las vías individuales están reguladas mediante lazos de retroalimentación que controlan la extensión y duración de la actividad señalizadora. Además, las vías de señalización no operan aisladamente; en su lugar, existen frecuentes relaciones cruzadas entre diferentes vías, de modo que la transducción de la señal intracelular en último término debe entenderse como una red integrada de vías conectadas. Como se indica en el Capítulo 5, la modelización computacional del comportamiento dinámico de dichas redes de señalización (véase Fig. 5.20) es centro actualmente de una activa investigación en biología de sistemas.

Bucles de realimentación y dinámica de señalización

La actividad de las vías de señalización está controlada mediante **lazos de retroalimentación**, que son similares a la regulación retroalimentaria principal de las vías metabólicas (véase Fig. 9.39). Un buen ejemplo de una retroalimentación negativa la proporciona la vía NF-κB (**Fig. 16.44**). NF-κB es activado por señales que desencadenan la proteólisis del inhibidor IκB,

◆ Además de su papel en la señalización Notch, la γ-secretasa es responsable de la escisión de la proteína precursora amiloide en proteína amiloide-β (Aβ), que favorece el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (véase el cuadro de Medicina molecular en el Capítulo 9).

permitiendo que NF-κB se transloque al núcleo e induzca la expresión de sus genes diana. Uno de los genes diana inducidos por NF-κB codifica IκB, de forma que la señalización vía NF-κB da lugar a la síntesis de nuevas moléculas de IκB, lo que inhibe una actividad continuada de NF-κB. Esta regulación es crítica porque la extensión y duración de la actividad NF-κB puede determinar la respuesta transcripcional de la célula. Por ejemplo, algunos genes diana son inducidos por la actividad transitoria de NF-κB, persistiendo tan solo 30-60 minutos, mientras que la inducción de otros genes requiere de varias horas de señalización mantenida por parte de NF-κB.

La señalización por parte de la MAP quinasa ERK proporciona otro ejemplo de la importancia de la duración de la señalización. En un modelo bien estudiado de la diferenciación celular en respuesta al factor de crecimiento (NGF), la señalización vía ERK puede dar lugar a la proliferación celular o a la diferenciación neuronal dependiendo de la duración de la actividad de ERK. En particular, la activación transitoria de ERK (durante 30-60 minutos) estimula la proliferación celular, pero la activación mantenida de ERK durante 2-3 horas induce la diferenciación de las células tratadas con NGF en neuronas. A pesar de que el mecanismo por el que estas diferencias en la duración de la actividad de ERK dan lugar a consecuencias biológicas tan diferentes sigue sin conocerse, resulta evidente que las consideraciones cuantitativas de la actividad señalizadora son críticas para la respuesta celular.

Redes y relaciones cruzadas

Las **relaciones cruzadas** se refieren a la interacción de una vía de señalización con otra, que integra las actividades de diferentes vías en la célula. Por ejemplo, se producen múltiples interferencias entre las vías PI 3-cinasa/Akt/mTOR1 y Ras/Raf/MEK/ERK (**Fig. 16.45**). Estas dos vías de señalización son activadas en etapas posteriores de la vía de los receptores de proteína-tirosina-cinasa y resultan esenciales en el control de la proliferación y la supervivencia de las células. El diálogo que se establece entre ellas contiene puntos de regulación en sentido positivo y negativo, que sirven para coordinar sus actividades en el interior de la célula.

Un ejemplo interesante en el que la duración de la señalización se combina con relaciones cruzadas procede de los estudios sobre receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores están relacionados con la señalización de quinasas MAP por β-arrestinas, que fueron identificadas primero como proteínas reguladoras que desactivan la señalización de receptores acoplados a proteínas G en proteínas G (**Fig. 16.46**). La actividad de señalización de estos receptores se desactiva como consecuencia de la fosforilación por una familia de proteína quinasas denominadas GRK (quinasas de receptores acoplados a proteínas G), seguido por la asociación de la β-arrestina con el receptor fosforilado. Sin embargo, las β-arrestinas hacen más que desactivar la señalización a proteínas G: también actúan como moléculas de señalización en sí para estimular vías posteriores adicionales, que incluyen vías de no receptores tirosina quinasas (p. ej., miembros de la familia Src) y quinasas MAP. En particular, la β-arrestina actúa como una proteína *scaffold* para la señalización Raf-MEK-ERK, uniendo directamente esta vía de las quinasas MAP con receptores acoplados a proteínas G.

Las extensas relaciones cruzadas entre vías de transducción de señales individuales significan que varias vías interaccionan entre sí para formar **redes de señalización** dentro de la célula. Por tanto, para comprender a fondo la señalización de las células es necesario ir más allá del análisis de vías individuales para el desarrollo de modelos de redes que predigan el comportamiento dinámico de las vías de señalización interconectadas que, en última instancia, provocan una respuesta biológica.

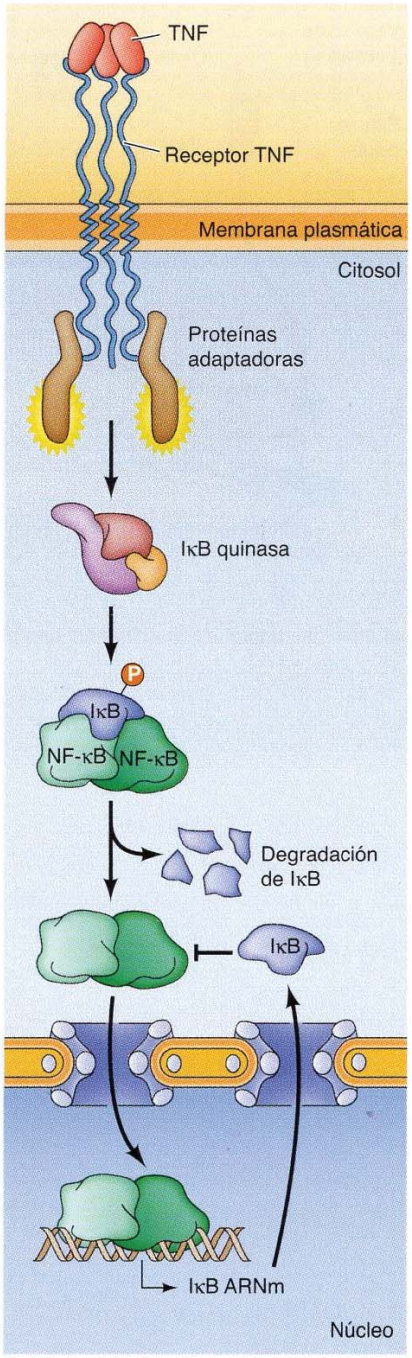


FIGURA 16.44 Inhibición mediante retroalimentación de NF-κB. NF-κB es activado como resultado de la fosforilación y degradación de IκB (véase Fig. 16.40), permitiendo que NF-κB se transloque al núcleo y active la transcripción de genes diana. Uno de los genes activados por NF-κB codifica para IκB, generando un lazo de retroalimentación que inhibe la actividad de NF-κB.

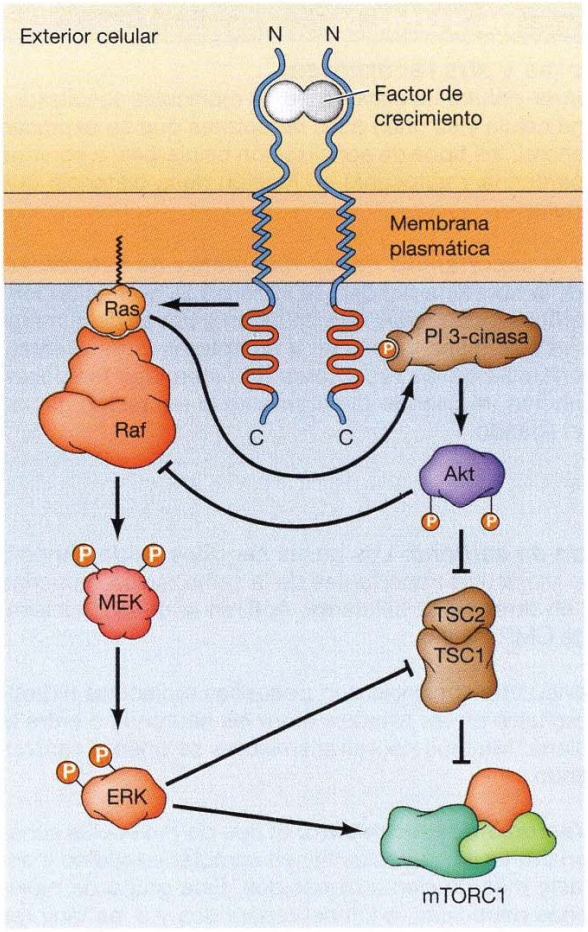


FIGURA 16.45 Diálogo entre las vías de señalización ERK y PI 3-cinasa. Las vías Ras/Raf/MEK/ERK y PI 3-cinasa/Akt/mTORC1 están conectadas por interferencias en sentido positivo y negativo, como activación de la PI 3-cinasa por parte de Ras, inhibición de Raf por Akt, inhibición de TSC1/2 por ERK, y activación de mTORC1 por ERK.

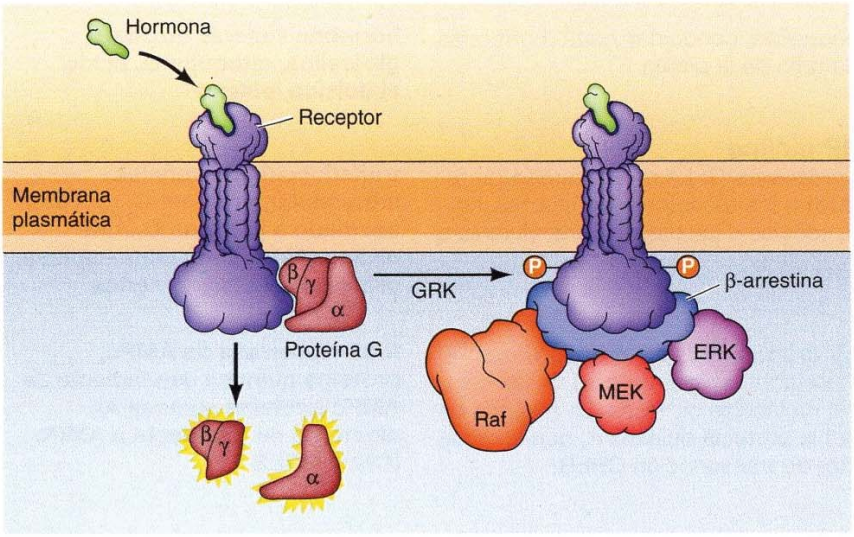


FIGURA 16.46 Relaciones cruzadas entre receptores acoplados a proteínas G y señalización ERK por β-arrestina. La unión a ligandos estimula los receptores acoplados a proteínas G, lo que conduce a la activación de proteínas G. La actividad de los receptores se inactiva como consecuencia de la fosforilación por las GRK y la asociación de la β-arrestina con el receptor fosforilado. La β-arrestina actúa también como proteína *scaffold* para Raf, MEK y ERK, uniendo los receptores acoplados a proteínas G con la vía de señalización ERK.

RESUMEN

Moléculas señalizadoras y sus receptores

Tipos de señalización célula-célula: La mayoría de las moléculas señalizadoras son secretadas por una célula y se unen a los receptores que se expresan en una célula diana. En general, los tipos de señalización célula-célula son tres (señalización endocrina, paracrina y autocrina) en función de la distancia que tienen que recorrer las señales.

señalización endocrina, hormona, señalización paracrina, señalización autocrina

Hormonas esteroideas y la superfamilia de los receptores de esteroides: Las hormonas esteroideas, la hormona tiroidea, la vitamina D_3 y el ácido retinoico son moléculas hidrofóbicas pequeñas que difunden a través de la membrana plasmática de sus células diana y se unen a receptores intracelulares. Los miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides funcionan como factores de transcripción, regulando directamente la expresión génica en respuesta a la unión del ligando.

Ver Animación 16.1

hormona esteroidea, testosterona, estrógeno, progesterona, corticosteroide, glucocorticoide, mineralocorticoide, ecdisona, brasinosteroide, hormona tiroidea, vitamina D_3, ácido retinoico, retinoide, superfamilia de los receptores de esteroides

Óxido nítrico y monóxido de carbono: Los gases sencillos óxido nítrico y monóxido de carbono son moléculas importantes de la señalización paracrina en el sistema nervioso y en otros tipos celulares. Activan la guanilil ciclasa, para producir la síntesis de GMP cíclico.

guanilil ciclasa, GMP cíclico, segundo mensaje

Neurotransmisores: Los neurotransmisores son pequeñas moléculas hidrofílicas que transportan las señales en las sinapsis entre las neuronas o entre la neurona y otras células diana. Muchos neurotransmisores se unen a canales iónicos regulados por ligando.

neurotransmisor

Hormonas peptídicas y factores de crecimiento: El tipo de moléculas señalizadoras más amplio y variado en los animales tienen carácter peptídico y oscilan entre unos pocos hasta más de cien aminoácidos. Este grupo de moléculas incluye a las hormonas peptídicas, a los neuropéptidos y a los factores de crecimiento.

hormona peptídica, neuropéptido, encefalina, endorfina, neurohormona, factor de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), citoquina, factor de crecimiento unido a la membrana

Eicosanoides: Los eicosanoides son un tipo de lípidos que intervienen en la señalización paracrina y autocrina.

eicosanoide, prostaglandina, prostaciclina, tromboxano, leucotrieno

Hormonas vegetales: Unas moléculas pequeñas, conocidas como hormonas vegetales, regulan el crecimiento y el desarrollo de la planta.

hormona vegetal, auxina, giberelina, citoquinina, ácido abscísico, etileno

Señalización de proteínas G y AMP cíclico

Proteínas G y receptores acoplados a proteínas G: La mayor familia de receptores de la superficie celular, que incluye a los receptores de muchas hormonas y neurotransmisores, transmite las señales a las dianas intracelulares a través de la acción de proteínas G.

Ver Animación 16.2

transducción de señales intracelular, proteína G, receptor asociado a proteína G, AMP cíclico (AMPc), adenilato ciclasa, proteína G heterotrimérica

Vía del AMPc: segundos mensajeros y la fosforilación de proteínas: El AMP cíclico es un segundo mensajero importante en la respuesta de las células animales a diversidad de hormonas y a moléculas olorosas. La mayoría de las acciones del AMPc están mediadas por la proteína quinasa A, que fosforila tanto a enzimas metabólicas como al factor de transcripción CREB.

Ver Animación 16.3

fosfodiesterasa de AMPc, proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A), elemento de respuesta a AMPc (CRE), CREB

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

GMP cíclico: El GMP cíclico también es un segundo mensajero importante en las células animales. Su papel mejor caracterizado es en la recepción visual en el ojo de vertebrados.

rodopsina, transducina, fosfodiesterasa de GMPc

Tirosina quinasas y señalización por vías de quinasas MAP, PI 3-quinasa y fosfolipasa C/calcio

Receptores tirosina quinasas: Los receptores para la mayor parte de los factores de crecimiento son tirosina quinasas.

receptor tirosina quinasa, autofosforilación, dominio SH2

Ver Vídeo 16.1

No receptores tirosina quinasas: Muchos receptores actúan en asociación con no receptores tirosina quinasas. Los receptores de citoquinas están asociados con la familia JAK de tirosina quinasas, que fosforilan y activan factores de transcripción STAT. Los no receptores tirosina quinasas de la familia Src actúan con posterioridad a diversos receptores de factores de crecimiento y citoquinas así como a integrinas y otras moléculas de adhesión celular.

no receptor tirosina quinasa, superfamilia de receptores de citoquinas, quinasa de Janus (JAK), proteína STAT, Src, FAK

Vía de las quinasas MAP: La vía de las quinasas MAP es una cadena de proteína quinasas conservada, que se activa a partir de varias señales extracelulares. En las células animales, las formas mejor caracterizadas de MAP quinasas se acoplan a los receptores del factor de crecimiento por una pequeña proteína de unión a GTP denominada Ras, que inicia la cascada de proteína quinasas que conduce a la activación de la quinasa MAP (ERK). Entonces, ERK fosforila a varias proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo a factores de transcripción que inducen la expresión de genes tempranos inmediatos. Otras vías de las MAP quinasas median respuestas de las células de mamíferos a la inflamación y el estrés. Los componentes de las vías de las MAP quinasas están organizados por las proteínas *scaffold,* que juegan un papel importante en mantener la especificidad de la señalización de las MAP quinasas.

quinasa MAP, ERK, Ras, Raf, MEK (MAP-cinasa / ERK-cinasa), factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), proteína activadora de la GTPasa, gen temprano inmediato, elemento de respuesta al suero (SRE), factor de respuesta al suero (SRF), Elk-1, gen de respuesta secundaria, proteínas *scaffold*

Vías de PI 3-quinasa/Akt y mTOR: El fosfolípido PIP_2 de la membrana plasmática puede ser fosforilado en un segundo mensajero PIP_3 diferente por la PI 3-quinasa. Se produce así la activación de la serina/treonina quinasa Akt, que tiene un papel fundamental en la supervivencia celular. Una de las dianas de la señalización Akt es la proteína quinasa mTOR, que es un regulador central del crecimiento de las células y se combina con la síntesis de proteínas y la autofagia para la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes y energía celular.

fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), fosfatidilinositido (PI) 3-quinasa, fosfatidilinositol 3,4,5- trisfosfato (PIP_3), Akt, mTOR

Fosfolípidos C y Ca^{2+}: Los fosfolípidos y el Ca^{2+} son segundos mensajeros comunes, que se activan con posterioridad (*downstream*) a los receptores asociados a proteína quinasa y las proteínas G. La hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) da lugar al diacilglicerol (DAG) y al inositol 1,4,5, trifosfato (IP_3) que, respectivamente, activan a la proteína quinasa C y movilizan el Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Los niveles elevados de Ca^{2+} intracelular activan varias proteínas diana, incluyendo a las proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina. En las células excitables eléctricamente del músculo y del sistema nervioso, el nivel del Ca^{2+} citosólico aumenta al abrirse los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en la membrana plasmática y los receptores de rianodina en el retículo sarcoplásmico y endoplásmico.

fosfolipasa C (PLC), diacilglicerol (DAG), inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), proteína quinasa C, calmodulina, CaM quinasa, receptor de rianodina

Receptores acoplados a factores de transcripción

Vía TGF-β/Smad: Los miembros de la familia de receptores de TGF-β son proteína-serina/treonina quinasas que fosforilan y activan directamente factores de transcripción Smad.

factor de crecimiento transformador β (TGF-β), Smad

Señalización vía NF-κB: Los miembros de la familia de factores de transcripción NF-κB se activan en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento y una diversidad de otros estímulos. Su activación está mediada por la fosforilación y degradación de subunidades inhibitorias IκB.

NF-κB, factor de necrosis tumoral, receptor tipo Toll, IκB

RESUMEN

Vías Hedgehog, Wnt y Notch: Las vías Hedgehog, Wnt y Notch juegan papeles clave en la determinación del destino celular y la formación de patrones durante el desarrollo animal. Las vías de señalización Hedgehog y Wnt actúan previniendo la degradación de factores de transcripción que forman complejos en el citoplasma. La señalización vía Notch está mediada por interacciones directas célula-célula, que inducen la escisión proteolítica de Notch, seguida de la translocación del dominio intracelular de Notch al núcleo donde interacciona con un factor de transcripción para afectar a la expresión de genes diana.

Dinámica y redes de señalización

Bucles de retroalimentación y dinámica de señalización: La actividad de las vías de señalización en el interior de la célula está regulada por lazos de retroalimentación que controlan la extensión y duración de la señalización. Las diferencias cuantitativas en la actividad pueden ser fundamentales para las consecuencias biológicas de las vías de señalización.

Redes y relaciones cruzadas: Diferentes vías de señalización interaccionan mediante relaciones cruzadas para regular la actividad de las otras vías. Las extensas redes cruzadas que existen entre vías individuales dan lugar a la formación de complejas redes de señalización. Una comprensión completa de la señalización en el interior celular requerirá el desarrollo de modelos de redes cuantitativas.

PALABRAS CLAVE

Hedgehog, Wnt, Notch

bucle de retroalimentación

relaciones cruzadas, red de señalización

Preguntas

1. ¿Cuál es la diferencia entre la señalización paracrina y la endocrina?
2. ¿En qué difieren la señalización por moléculas señal hidrofóbicas, como las hormonas esteroídicas, de la señalización por moléculas señal hidrofílicas, como las hormonas proteicas?
3. ¿Cómo actúa la aspirina para reducir la inflamación y la coagulación sanguínea?
4. Las hormonas que activan a un receptor acoplado a la proteína G_s estimula la proliferación de las células tiroideas. ¿Cómo afectarían inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa a la proliferación de estas células?
5. El receptor de la epinefrina está asociado a G_s, mientras que el receptor de la acetilcolina (en las células del músculo cardíaco) está asociado a G_i. Supón que tienes que construir una molécula recombinante que contenga las secuencias extracelulares del receptor de la epinefrina junto a las secuencias citosólicas del receptor de la acetilcolina. ¿Qué efecto causaría la epinefrina sobre los niveles de AMPc en las células que expresen este receptor recombinante? ¿Cuál sería el efecto de la acetilcolina?
6. ¿Cómo afectaría la sobreexpresión de la proteína fosfatasa 1 a la inducción de genes inducibles por AMPc, en respuesta a la estimulación hormonal de las células diana apropiadas? ¿Afectaría la proteína fosfatasa 1 a la función de los canales iónicos regulados por AMPc responsables de la recepción de moléculas olorosas?
7. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un dímero constituido por dos cadenas polipeptídicas. ¿Cuál sería el efecto previsto de los monómeros de PDGF en la señalización desde el receptor de PDGF?
8. Has generado una versión truncada del receptor de EGF que carece del dominio tirosina quinasa. La expresión de este receptor truncado inhibe la respuesta de las células a EGF. ¿Por qué?
9. Un miembro específico de la familia STAT induce determinados genes hepáticos en respuesta a la estimulación por una citoquina. ¿Cómo se vería afectada la inducción de estos genes si sobreexpresaras un mutante dominante negativo de JAK?
10. Estás estudiando un gen inmediato temprano que es inducido por la vía Ras/Raf/MEK/ERK en respuesta al tratamiento de fibroblastos con factor de crecimiento. ¿Cómo afectaría la expresión de ARNsi frente al factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras a la inducción de este gen?
11. ¿De qué modo la vía de la PI 3-quinasa/Akt regula la síntesis de proteínas celulares como respuesta a la estimulación del factor de crecimiento?
12. Estás estudiando un gen que es inducido por la vía de señalización Wnt. Para determinar el papel desempeñado por la β-catenina, haces diferentes mutantes de la β-catenina específicos de sitio. Descubres que cambiar un residuo específico de lisina (Lys) a arginina (Arg) da lugar a la acumulación nuclear de β-catenina y a la expresión constitutiva del gen (incluso en ausencia de estimulación por Wnt). ¿Cuál es el mecanismo más probable por el que esta mutación altera la actividad de la β-catenina?

Bibliografía

Moléculas señalizadoras y sus receptores

Andrea, J., R. Gallini and C. Betsholtz. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22: 1276–1312. [R]

Arai, K., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai and T. Yokota. 1990. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783–836. [R]

Calabrese, V., C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield and A. M. G. Stella. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 766–775. [R]

Cao, Y. 2013. Multifarious function of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends Mol. Med.* 19: 460–473. [R]

Cohen, P. 2006. The twentieth century struggle to decipher insulin signaling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 867–873. [R]

Cohen, S. 2008. Origins of growth factors: NGF and EGF. *J. Biol. Chem.* 283: 33793–33797. [R]

Cunningham, T. J. and G. Duester. 2015. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 110–123. [R]

Hess, D. T., A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E. Marshall and J. S. Stamler. 2005. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150–166. [R]

Hetherington, A. M. and L. Bardwell. 2011. Plant signaling pathways: a comparative evolutionary overview. *Curr. Biol.* 21: R317–R319. [R]

Hill, B. G., B. P. Dranka, S. M. Bailey, J. R. Lancaster Jr. and V. M. Darley-Usmar. 2010. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* 285: 19699–19704. [R]

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154–1162. [R]

Li, L. and P. K. Moore. 2007. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. *Biochem. Soc. Tran.* 35: 1138–1141. [R]

McDonnell, D. P. and J. D. Norris. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296: 1642–1644. [R]

Nagy, L. and J. W. R. Schwabe. 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 29: 317–324. [R]

Ornitz, D. M. and P. J. Marie. 2015. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* 29: 1463–1486. [R]

Santner, A. and M. Estelle. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* 459: 1071–1078. [R]

Sonoda, J., L. Pei and R. M. Evans. 2008. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Let.* 582: 2–9. [R]

Turner, N., and R. Grose. 2010. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 116–129. [R]

Wang, D. and R. N. DuBois. 2010. Eicosanoids and cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 181–193. [R]

Señalización de proteínas G y AMP cíclico

Audet, M. and M. Bouvier. 2012. Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell* 151: 14–23. [R]

Conti, M. and J. Beavo. 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 481–511. [R]

Hofmann, F. 2005. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 280: 1–4. [R]

Hofmann, K. P., P. Scheerer, P. W. Hildebrand, H.-W. Choe, J. H. Park, M. Heck and O. P. Ernst. 2009. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* 34: 540–552. [R]

Lefkowitz, R. J. 2004. Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 413–422. [R]

Malbon, C. C. 2005. G proteins in development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 689–701. [R]

Mayr, B. and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 599–609. [R]

Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636–1639. [R]

Oldham, W. M. and H. E. Hamm. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 60–71. [R]

Siderovski, D. P. and F. S. Willard. 2005. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Intl. J. Biol. Sci.* 1: 51–66. [R]

Taylor, S. S., C. Kim, C. Y. Cheng, S. H. J. Brown, J. Wu and N. Kannan. 2008. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 16–26. [R]

Tirosina quinasas y señalización por las vías de las quinasas MAP, las PI 3-quinasas y la fosfolipasa C/calcio

Baker, S. J., S. G. Rane and E. P. Reddy. 2007. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26: 6724–6737. [R]

Brazil, D. P., Z.-Z. Yang, and B. A. Hemmings. 2004. Advances in protein kinase B signaling: *AKT*ion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 29: 233–242. [R]

Cavallaro, U. and E. Dejana. 2011. Adhesion molecule signaling: not always a sticky business. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 189–197. [R]

Clapham, D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell* 131: 1047–1058. [R]

Corcoran, E. E. and A. R. Means. 2001. Defining Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 2975–2978. [R]

Efeyan, A., W. C. Comb and D. M. Sabatini. 2015. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517: 302–310. [R]

Eijkelenboom, A. and B. M. T. Burgering. 2013. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 83–97. [R]

Good, M. C., J. G. Zalatan and W. A. Lim. 2011. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332: 680–686. [R]

Hunter, T. and B. M. Sefton. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1311–1315. [P]

Irvine, R. F. 2003. 20 years of Ins(1,4,5)P3 and 40 years before. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 586–590. [R]

Johnson, G. L. and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912. [R]

Jope, R. S. and G. V. W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95–102. [R]

Lemmon, M. A. and J. Schlessinger. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141: 1117–1134. [R]

Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912–1934. [R]

Matallanas, D., M. Birtwistle, D. Romano, A. Zebisch, J. Rauch, A. von Kriegsheim and W. Kolch. 2011. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2: 232–260. [R]

McKay, M. M. and D. K. Morrison. 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26: 3113–3121. [R]

Mihaylova, M. M. and R. J. Shaw. 2011. The AMPK signaling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biol.* 13: 1016–1023. [R]

Miranti, C. K. and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.* 4: E83–E90. [R]

Mitra, S. K. and D. D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 516–523. [R]

Parsons, S. J. and J. T. Parsons. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23: 7906–7909. [R]

Raman, M., W. Chen and M. H. Cobb. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26: 3100–3112. [R]

Schindler, C., D. E. Levy and T. Decker. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J. Biol. Chem.* 282: 20059–20063. [R]

Stepniak, E., G. L. Radice and V. Vasioukhin. 2009. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1:a002949. [R]

Turjanski, A. G., J. P. Vaque and J. S. Gutkind. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26: 3240–3253. [R]

Vanhaesebroeck, B., L. Stephens and P. Hawkins. 2012. PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 195–203. [R]

Venkatachalam, K., D. B. van Rossum, R. L. Patterson, H.-T. Ma and D. L. Gill. 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell. Biol.* 4: E263–272. [R]

Zalk, R., S. E. Lahnart and A. R. Marks. 2007. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 367–385. [R]

Zoncu, R., A. Efeyan and D. M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Mol. Cell Biol.* 12: 21–35. [R]

Receptores acoplados a factores de transcripción

Briscoe, J. and P. P. Thérond. 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 416–429. [R]

Clevers, H., K. M. Loh and R. Nusse. 2014. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346: 1248012. [R]

Gay, N. J. and M. Gangloff. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Ann. Rev. Biochem.* 76: 141–165. [R]

Hayden, M. S. and S. Ghosh. 2012. NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26:203–234. [R]

Ng, J. M. Y. and T. Curran. 2011. The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nature Rev. Cancer* 11: 493–501. [R]

Ingham, P. W., Y. Nakano and C. Seger. 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signaling across the metazoa. *Nature Rev. Genet.* 12: 393–406. [R]

Kitisin, K., T. Saha, T. Blake, N. Golestaneh, M. Deng, C. Kim, Y. Tang, K. Shetty, B. Mishra and L. Mishra. 2007. TGF- signaling in development. *Science STKE* 2007: cm1. [R]

Kopan, R. and M. X. G. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216–233. [R]

Massagué, J., J. Seoane and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19: 2783–2810. [R]

Niehrs, C. 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 767–779. [R]

Schmierer, B. and C. S. Hill. 2007. TGF - SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 970–982. [R]

Redes de señalización

Aldridge, B. B., J. M. Burke, D. A. Lauffenburger and P. K. Sorger. 2006. Physicochemical modelling of cell signalling pathways. *Nature Cell Biol.* 8: 1195–1203. [R]

Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott and D. Baltimore. 2002. The I B—NF- B signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science* 298: 1241–1245. [P]

Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy. 2005. Transduction of receptor signals by -arrestins. *Science* 308: 512–517. [R]

Ma'ayan, A., S. L. Jenkins, S. Neves, A. Hasseldine, E. Grace, B. Dubin-Thaler, N. J. Eungdamrong, G. Weng, P. T. Ram, J. J. Rice, A. Kershenbaum, G. A. Stolovitzky, R. D. Blitzer, and R. Iyengar. 2005. Formation of regulatory patterns during signal propagation in a mammalian cellular network. *Science* 309: 1078–1083. [P]

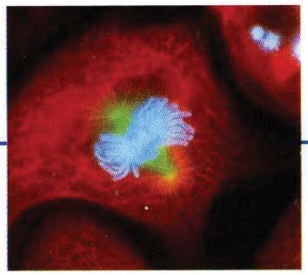
Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179–185. [R]

Mendoza, M. C., E. E. Er and J. Blenis. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 36: 320–328. [R]

Papin, J. A., T. Hunter, B. O. Palsson and S. Subramaniam. 2005. Reconstruction of cellular signaling networks and analysis of their properties. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 99–111. [R]

Purvis, J. E. and G. Lahav. 2013. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell* 152: 945–956. [R]

Zhu, X., M. Gerstein and M. Snyder. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev.* 21: 1010–1024. [R]*Sci. USA* 105: 5955–5962. [P]



Capítulo 17

Ciclo celular

Ciclo celular eucariota 651

Reguladores de la progresión del ciclo celular 657

Acontecimientos de la fase M 670

Meiosis y fecundación 679

EXPERIMENTO CLAVE: Descubrimiento del MPF 658

EXPERIMENTO CLAVE: La identificación de la ciclina 662

La capacidad de autorreproducirse probablemente sea la característica fundamental de las células —al igual que podría decirse de los seres vivos—. Todas las células se reproducen mediante su división en dos, cada célula parental dando lugar a dos células hijas al final de cada ciclo de división celular. Estas células hijas a su vez pueden crecer y dividirse, dando lugar a una población celular a partir del crecimiento y la división de una única célula parental y de su progenie. En el caso más sencillo, estos ciclos de crecimiento y división permiten a una única bacteria, tras la incubación, durante una noche, en una placa de agar con medio provisto de nutrientes, formar una colonia constituida por una progenie de millones de células. En un caso más complejo, ciclos repetidos de crecimiento y división celular suponen el desarrollo de una célula huevo fecundada, dando lugar a las más de 10^{14} células que componen el cuerpo humano.

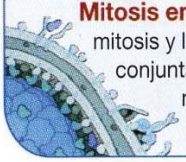
La división de todas las células ha de ser finamente regulada y coordinada con el crecimiento celular y con la replicación del ADN, para asegurar la formación de una progenie de células que contengan sus genomas completos. En las células eucariotas, la progresión a lo largo del ciclo celular la controla una serie de proteína quinasas que se han conservado desde las levaduras hasta los mamíferos. En los eucariotas superiores, esta maquinaria del ciclo celular a su vez está regulada por los factores de crecimiento que controlan la proliferación celular, lo que permite coordinar la división de las células individuales con las necesidades del organismo como un todo. No debe extrañar que las alteraciones en la regulación del ciclo celular sean una causa frecuente de la proliferación anormal de las células cancerosas; por tanto, los estudios acerca del ciclo celular y del cáncer se han solapado, de igual manera que están relacionados los estudios acerca del cáncer y de las vías de señalización celular, como se vio en el Capítulo 16.

Ciclo celular eucariota

El ciclo de la división de la mayoría de las células consiste en cuatro procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del ADN, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular. En las bacterias, el crecimiento celular y la replicación del ADN tienen lugar durante la mayor parte del ciclo celular, y los cromosomas duplicados se distribuyen a las células hijas asociados a la membrana plasmática. Sin embargo, en los eucariotas el ciclo celular es más complejo y consiste en cuatro fases diferenciadas. Aunque el crecimiento celular suele ser un proceso continuo, el ADN se sintetiza sólo durante una fase del ciclo celular y, entonces, los cromosomas replicados se distribuyen a los núcleos hijos mediante una

VÍDEO 17.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v17.1



Mitosis en tiempo real. La mitosis y la citocinesis definen conjuntamente la fase mitótica del ciclo de una célula animal

compleja serie de procesos que preceden a la división celular. La progresión a través de estas etapas del ciclo celular está controlada mediante un sistema regulador conservado, que no sólo coordina los diferentes procesos del ciclo celular sino que también acopla el ciclo celular con las señales extracelulares que controlan la proliferación celular.

ANIMACIÓN 17.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.1

Fases del ciclo celular. El ciclo celular de la mayoría de las células eucariotas está dividido en cuatro fases discretas: M, G_1, S y G_2.

Fases del ciclo celular

Un ciclo celular eucariota típico es el de las células humanas en cultivo, que se dividen aproximadamente cada 24 horas. Visto al microscopio, el ciclo celular se divide en dos etapas fundamentales: **mitosis** e **interfase**. La mitosis (división del núcleo) es la etapa más llamativa del ciclo, que corresponde a la separación de los cromosomas hijos y termina, generalmente, en la división celular (**citocinesis**). Sin embargo, la mitosis y la citocinesis duran cerca de una hora, por lo que aproximadamente el 95% del ciclo celular transcurre en la interfase —el intervalo entre dos mitosis—. Durante la interfase los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que el núcleo presenta un aspecto uniforme. Sin embargo, a nivel molecular, en la interfase es cuando ocurren el crecimiento celular y la replicación del ADN de manera sucesiva, lo que deja a la célula preparada para la división.

La célula crece a un ritmo continuado durante la interfase, y la mayoría de las células duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente. En cambio, el ADN sólo se sintetiza durante una parte de la interfase. Así, la duración de la síntesis del ADN divide el ciclo de las células eucariotas en cuatro fases diferenciadas (**Fig. 17.1**). La **fase M** del ciclo corresponde a la mitosis, a la que suele seguir la citocinesis. A esta fase le sigue la **fase G_1** (*gap 1*), que corresponde al intervalo (*gap*) entre la mitosis y el comienzo de la replicación del ADN. Durante G_1 la célula es metabólicamente activa y está creciendo, pero no se replica su ADN. Seguidamente tiene lugar la **fase S** (síntesis), durante la que se produce la replicación del ADN. Tras finalizar la síntesis del ADN se produce la **fase G_2** (*gap 2*), durante la que prosigue el

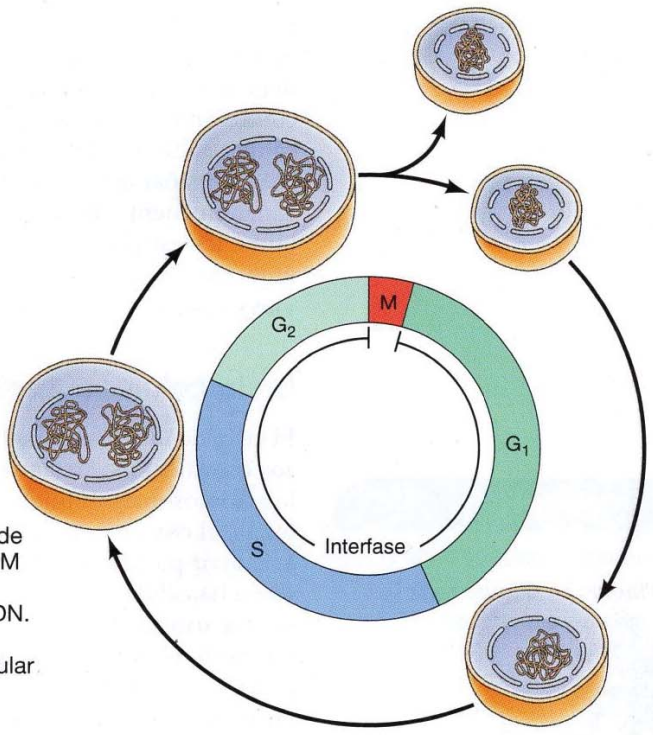


FIGURA 17.1 Fases del ciclo celular. El ciclo de división de la mayoría de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, G_1, S y G_2. A la fase M (mitosis) le suele seguir la citocinesis. La fase S es el período durante el que tiene lugar la replicación del ADN. La célula crece durante la interfase, que incluye a las fases G_1, S y G_2. La duración de las fases del ciclo celular que se muestran aquí es característica de las células de proliferación rápida de mamífero.

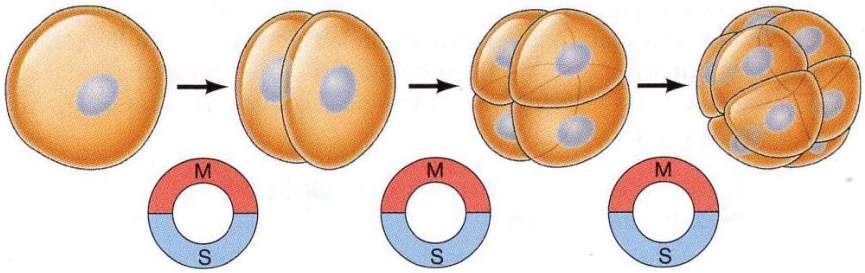


FIGURA 17.2 Ciclos de las células embrionarias. En los ciclos de células embrionarias tempranas, el citoplasma del ovocito se divide con rapidez para dar lugar a células más pequeñas. Las células no crecen durante estos ciclos, los cuales carecen de G_1 y de G_2, y consisten simplemente en la alternancia de cortas fases S con fases M.

ANIMACIÓN 17.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.2

Ciclos de las células embrionarias. Durante los ciclos tempranos de las células embrionarias, las células no crecen, sino que se dividen para formar células progresivamente más pequeñas.

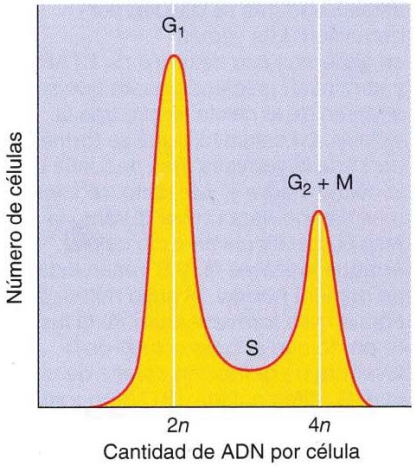


FIGURA 17.3 Determinación de la cantidad de ADN celular. Una población de células se marca con una tinción fluorescente que se une al ADN. Entonces se hace pasar a las células por un citofluorímetro de flujo, que mide la intensidad de la fluorescencia en las células individuales. Los datos se representan como el número de células frente a la intensidad de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN. La distribución muestra dos picos, que corresponden a las células con un contenido de ADN de $2n$ y de $4n$; estas células están en las fases G_1 y G_2/M del ciclo, respectivamente. Las células en la fase S tienen una cantidad de ADN entre $2n$ y $4n$, y se distribuyen entre los dos picos.

crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis.

La duración de estas fases del ciclo celular varía considerablemente según los distintos tipos de células. Para una célula de proliferación rápida humana típica, con una duración total del ciclo de 24 horas, la fase G_1 dura unas 11 horas, la fase S unas 8 horas, G_2 cerca de 4 horas y M una hora, aproximadamente. Sin embargo, otros tipos celulares pueden dividirse más rápidamente. Las levaduras en gemación, por ejemplo, atraviesan las cuatro fases del ciclo celular sólo en unos 90 minutos. Incluso, en células embrionarias tempranas tras la fecundación del óvulo tienen lugar ciclos celulares más cortos (30 minutos o menos) (**Fig. 17.2**). Pero en este caso no se produce crecimiento celular. Por el contrario, mediante estos ciclos celulares en el embrión temprano el citoplasma del huevo se divide rápidamente en células más pequeñas. En estos ciclos celulares en el embrión temprano no hay fase G_1 ni G_2, y el ADN se replica rápidamente, por lo que consisten en fases S muy cortas alternando con fases M.

A diferencia de la rápida proliferación en las células embrionarias, algunas células del animal adulto cesan por completo su división (p. ej., las células nerviosas) y muchas otras células sólo se dividen ocasionalmente, cuando es necesario reemplazar la pérdida de las células debido a una lesión o a la muerte celular. Entre este último tipo de células se incluyen a los fibroblastos de la piel, así como a las células de muchos órganos internos, como el hígado, el riñón y el pulmón. Como se tratará más adelante en la sección siguiente, estas células salen de G_1 para entrar en un estado de reposo del ciclo denominado G_0, en el que permanecen activas metabólicamente pero no proliferan. Algunas células que son detenidas en G_0 pueden volver a entrar en el ciclo celular cuando son invocadas para ello por las señales extracelulares apropiadas. Sin embargo, otros tipos de células, entre ellos las células más diferenciadas en los animales adultos, se retiran de forma permanente del ciclo celular y son incapaces de reanudar la proliferación.

El análisis del ciclo celular requiere que las células se identifiquen en las diferentes etapas indicadas anteriormente. Aunque las células mitóticas se pueden distinguir al microscopio, las células en las otras fases del ciclo (G_1, S y G_2) han de ser identificadas mediante criterios bioquímicos. En la mayoría de los casos, las células en estadios diferentes del ciclo celular se diferencian por su cantidad de ADN (**Fig. 17.3**). Por ejemplo, las células animales en G_1 son diploides (contienen dos copias de cada cromosoma), por lo que se dice que su cantidad de ADN es $2n$ (se designa por n al contenido de ADN haploide en el genoma). Durante la fase S, mediante la replicación se aumenta la cantidad de ADN de la célula de $2n$ a $4n$, por lo que las células en fase S tendrán una cantidad de ADN entre $2n$ y $4n$. El contenido de ADN se mantiene en $4n$ en las células en G_2 y en M, y se reduce a $2n$ tras la citocinesis. La cantidad de ADN celular se puede determinar experimentalmente

incubando las células con una tinción fluorescente que se una al ADN, y posteriormente analizando la intensidad de la fluorescencia en las células individuales por **citometría de flujo** o mediante un **separador celular de fluorescencia**; de esta manera se distinguen las células en las fases G_1, S y G_2/M del ciclo celular.

Regulación del ciclo celular por el crecimiento celular y por señales extracelulares

La progresión de las células a través del ciclo de división celular se regula por señales extracelulares del medio, así como por señales internas que supervisan y coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular. Un ejemplo de la regulación del ciclo celular por señales extracelulares lo proporciona el efecto de los factores de crecimiento sobre la proliferación de las células animales. Además, diversos procesos celulares como el crecimiento celular, la replicación del ADN y la mitosis, han de coordinarse durante el transcurso del ciclo celular. Esto se consigue mediante una serie de puntos de control que regulan la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular.

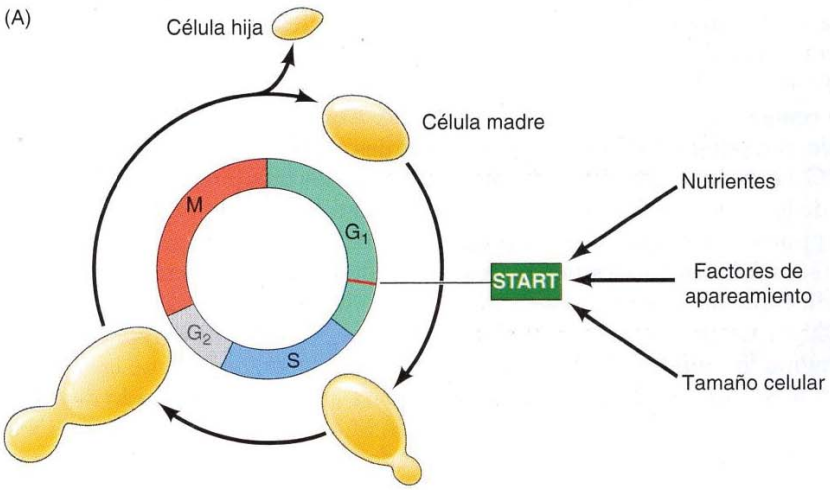
Uno de los puntos de regulación principales del ciclo celular, en muchos tipos celulares, se encuentra avanzada la fase G_1 y controla el paso de G_1 a S. Este punto de regulación se definió por primera vez en estudios de la levadura de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*), donde se le conoce como **START** (**Fig. 17.4**). Una vez que las células han rebasado el START, quedan determinadas a entrar en la fase S y a sufrir un ciclo de división celular. Sin embargo, rebasar el punto START es un proceso que está finamente regulado en el ciclo celular de la levadura, siendo controlado a través de señales externas, como la disponibilidad de nutrientes, y por el tamaño celular. Por ejemplo, si las levaduras se enfrentan a una carencia de nutrientes, paran su ciclo celular en START y entran en un estado de reposo en vez de proseguir a la fase S. Así, START supone un punto de decisión en el que la célula determina si hay suficientes nutrientes disponibles para avanzar a través del resto del ciclo celular. Los factores polipeptídicos que intervienen como señales para el apareamiento de las levaduras también detienen el ciclo celular en START, lo que permite fusionarse a las células de levadura haploides en vez de proseguir a la fase S.

Además de servir como un punto de decisión para supervisar señales extracelulares, START es el punto en el que se coordina el crecimiento de la célula con la replicación del ADN y con la división celular. La importancia de esta regulación se muestra de manera evidente en las levaduras de gema-

VÍDEO 17.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v17.2

División de la levadura de fisión.
La levadura de fisión se divide por fisión medial para producir dos células hijas de igual tamaño, que la convierten en un instrumento poderoso en la investigación del ciclo celular.



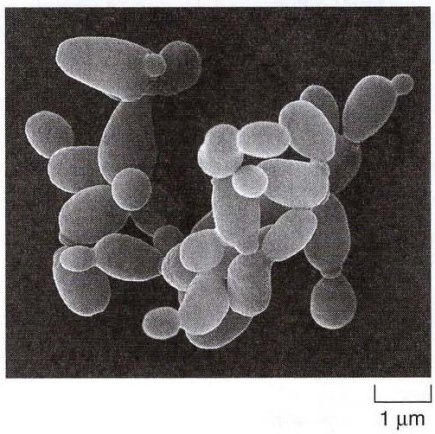


FIGURA 17.4 Regulación del ciclo celular de la levadura de gemación. (A) El ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* se regula principalmente en un punto de la fase G_1 avanzada, denominado START. El paso por START está controlado por la disponibilidad de nutrientes, de factores de apareamiento y por el tamaño celular. Cabe destacar que estas levaduras se dividen por gemación. Las yemas se generan justo después de START y continúan creciendo hasta que se separan de la célula madre tras la mitosis. La célula hija que se forma a partir de la yema es más pequeña que la célula madre y, por tanto, requiere más tiempo para crecer durante la fase G_1 del siguiente ciclo celular. Aunque las fases G_1 y S tienen lugar de manera normal, el huso mitótico comienza a formarse durante la fase S, por lo que el ciclo celular de la levadura de gemación carece de una fase G_2 diferenciada. (B) Micrografía al microscopio electrónico de barrido de *S. cerevisiae*. El tamaño de la yema refleja la situación de la célula en el ciclo.

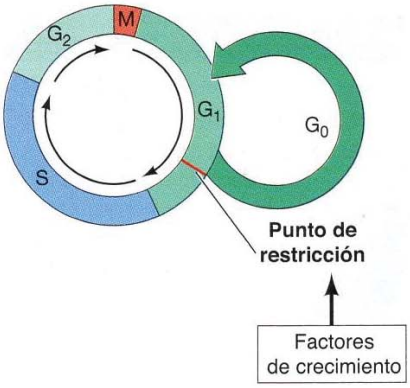


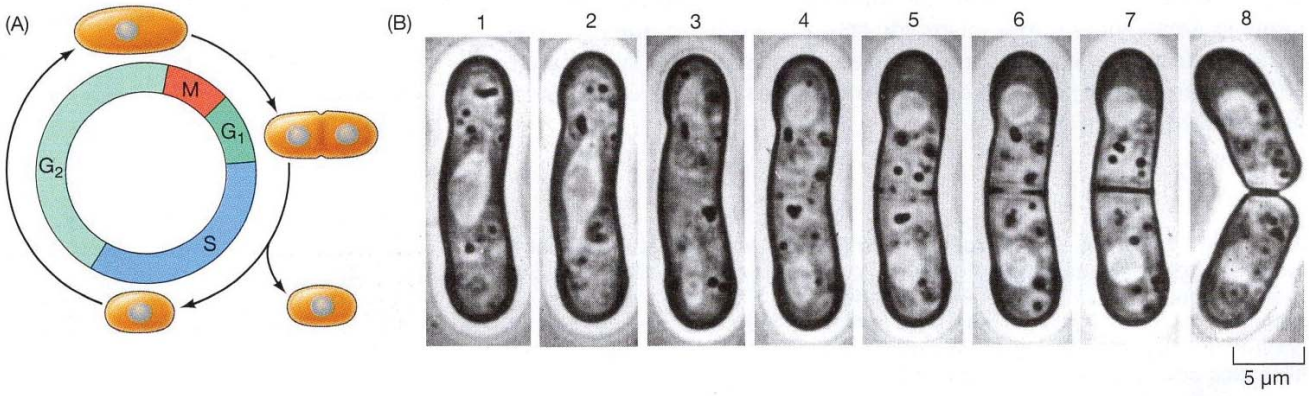
FIGURA 17.5 Regulación del ciclo de las células animales por factores de crecimiento. La disponibilidad de factores de crecimiento controla el ciclo de la célula animal en un punto de la fase G_1 avanzada, denominado punto de restricción. Si los factores de crecimiento no están disponibles durante G_1, las células entran en un estado en reposo del ciclo denominado G_0.

ción, en las que la división celular da lugar a una progenie de células de distintos tamaños: una célula madre grande y una célula hija pequeña. Para que las células de la levadura mantengan un tamaño constante, la célula hija pequeña debe crecer hasta alcanzar un tamaño mayor al de la célula madre, antes de volver a dividirse. Por tanto, se ha de controlar el tamaño de la célula para poder coordinar el crecimiento celular con los otros procesos del ciclo celular. Esta regulación se realiza mediante un mecanismo de control que requiere que la célula alcance un tamaño mínimo para poder rebasar el START. Por tanto, la célula hija pequeña pasa más tiempo en G_1 y crece más que la célula madre.

La proliferación de la mayoría de las células animales también se regula en la fase G_1 del ciclo celular. Concretamente, un punto de decisión de la G_1 avanzada, denominado **punto de restricción** en las células animales, funciona de manera análoga a como lo hace START en las levaduras (**Fig. 17.5**). Sin embargo, a diferencia de las levaduras, el paso de las células animales a través del ciclo celular se regula, principalmente, por factores de crecimiento extracelulares que son señales de proliferación celular, en vez de por la disponibilidad de nutrientes. En presencia de los factores de crecimiento apropiados, las células atraviesan el punto de restricción y entran en la fase S. Una vez que la célula ha rebasado el punto de restricción, queda determinada a proseguir a través de la fase S y del resto del ciclo celular, incluso en ausencia de la estimulación por los factores de crecimiento. Por otro lado, si los factores de crecimiento adecuados no están disponibles en G_1, la progresión a través del ciclo celular se para en el punto de restricción. La célula entra en un estado en reposo del ciclo celular denominado **G_0** en el que puede permanecer indefinidamente sin proliferar. Las células en G_0 son metabólicamente activas aunque cesa su crecimiento y su ritmo de síntesis de las proteínas es menor. Como ya se ha comentado, muchas células en los animales permanecen permanentemente en G_0, mientras que otras pueden reanudar la proliferación si son estimuladas por los factores de crecimiento apropiados o por otras señales extracelulares. Por ejemplo, los fibroblastos de la piel se mantienen detenidos en G_0 hasta que se les estimula a dividirse para reparar el daño causado por una herida. La proliferación de estas células se activa por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, que es liberado por las plaquetas de la sangre durante la coagulación sanguínea y actúa como una señal para la proliferación de los fibroblastos en la proximidad del tejido dañado.

Aunque la proliferación de la mayoría de las células se regula en G_1 , algunos ciclos celulares se controlan, en cambio, en G_2. Un ejemplo de esto es el ciclo celular de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (**Fig. 17.6**).

FIGURA 17.6 Ciclo celular de la levadura de fisión. (A) Las levaduras de fisión crecen por sus extremos, y se dividen formando una pared que atraviesa la zona media de la célula. A diferencia del ciclo de las levaduras de gemación, el ciclo celular de las levaduras de fisión tiene fases G_1, S, G_2 y M normales. Cabe destacar que la citocinesis tiene lugar en G_1. La longitud de la célula indica su situación en el ciclo. (B) Micrografías al microscopio óptico que muestran sucesivos estadios de la mitosis y de la citocinesis de *Schizosaccharomyces pombe*. (B, cortesía de C. F. Robinow, University of Western Ontario.)



A diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, el ciclo celular de *S. pombe* se regula básicamente a través del control del paso de G_2 a M, que es el punto principal en el que es supervisado el tamaño celular y la disponibilidad de nutrientes. En los animales, el ejemplo más característico de control del ciclo celular en G_2 lo proporcionan los oocitos. Los oocitos de los vertebrados pueden permanecer detenidos en G_2 durante largos períodos de tiempo (varias décadas en el ser humano) hasta que se activa su paso a la fase M, por la estimulación hormonal. De esta manera, las señales extracelulares pueden controlar la proliferación celular regulando el paso de las fases G_2 a M así como de G_1 a S del ciclo celular.

ANIMACIÓN 17.3

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.3

Puntos de control de ciclo celular. Diversos puntos de control funcionan a lo largo del ciclo celular para asegurar que los genomas completos de los genomas se transmitan a las células hijas.

Puntos de control del ciclo celular

Los mecanismos de control tratados en la sección anterior regulan la progresión del ciclo celular en respuesta al tamaño celular y a señales extracelulares, como los nutrientes o los factores de crecimiento. Pero además, los sucesos que tienen lugar durante las diferentes etapas del ciclo celular han de coordinarse entre sí de tal manera que ocurran en el orden adecuado. Por ejemplo, es de la mayor importancia que la célula no entre en mitosis hasta que haya finalizado la replicación del genoma. De lo contrario se produciría una división celular desastrosa, en la que las células hijas no heredarían una copia completa del material genético. En la mayoría de las células, esta coordinación entre las diferentes fases del ciclo celular depende de un sistema **puntos de control** que previenen la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente hayan sido completados.

Varios puntos de control del ciclo celular, denominados **puntos de control de daños al ADN**, garantizan que el ADN dañado no se replicará ni se transmitirá a las células hijas (**Fig. 17.7**). Estos puntos de control detectan secuencias de ADN dañado o replicado parcialmente y coordinan la progresión del ciclo celular para completar la replicación o la reparación del ADN. Los puntos de control de daños al ADN funcionan en las fases G_1, S y G_2 del ciclo celular. Por ejemplo, el punto de control de G_2 impide el comienzo de la mitosis en tanto en cuanto la célula no haya completado la replicación o reparado las lesiones existentes. El ADN dañado activa una vía de señalización que da lugar a la detención del ciclo celular. Por consiguiente, este punto de control G_2 impide la iniciación de la fase M hasta la compleción de la replicación y la reparación de todas las lesiones del genoma. Sólo entonces desaparece la inhibición de la progresión de la fase G_2 y se permite el comienzo de la mitosis y la distribución de los cromosomas completamente replicados entre ambas células hijas. De manera similar, la parada en el punto de control G_1 hace posible la reparación de cualquier lesión en el ADN con anterioridad al inicio de la fase S, en la que tendría lugar la replicación del ADN dañado. El punto de control de la fase S no solamente asegura una monitorización continua de la integridad del ADN para asegurar la reparación del ADN dañado con anterioridad a su replicación, sino que también representa un mecanismo de control de calidad que favorece la reparación de cualquier error producido en el transcurso de la replicación del ADN, como la incorporación de bases incorrectas o la replicación incompleta de secuencias del ADN.

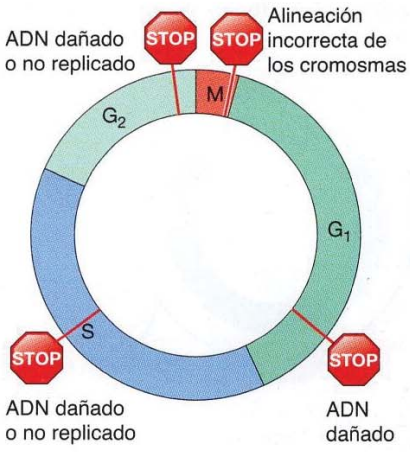


FIGURA 17.7 Puntos de control del ciclo celular. Varios puntos de control funcionan para asegurar que los genomas completos se transmiten a las células hijas. Los puntos de control del ADN dañado en G_1, S y G_2, dan lugar a la detención del ciclo celular en respuesta al ADN dañado o sin replicar. El punto de control de ensamblaje del huso detiene la mitosis si los cromosomas no están alineados correctamente en el huso mitótico.

Otro punto de control importante del ciclo celular, que mantiene la integridad del genoma, se localiza al final de la mitosis. Este punto de control de ensamblaje de huso supervisa que los cromosomas se alineen de manera correcta en el huso mitótico, lo que asegura que se distribuya un juego completo de cromosomas a cada célula hija. La alineación incorrecta de uno o más cromosomas en el huso mitótico provoca que la mitosis se detenga en la metafase, antes de la segregación de los cromosomas recién replicados a los núcleos de las células hijas. Gracias a este punto de control, los cromosomas no se segregan hasta que se disponga de un juego completo de cromosomas para ser distribuido a cada célula hija.

Reguladores de la progresión del ciclo celular

Uno de los descubrimientos más interesantes de la pasada década ha sido el esclarecimiento de los mecanismos moleculares que controlan la progresión de las células eucariotas a través del ciclo de división celular. Nuestro conocimiento actual de la regulación del ciclo celular se debe a la convergencia de resultados obtenidos mediante experimentos con organismos tan distintos como las levaduras, erizos de mar, ranas y mamíferos. Estos estudios han revelado que el ciclo celular de todos los eucariotas está controlado por un conjunto de proteína quinasas, conservado en los distintos organismos, que son las responsables de inducir el paso de un estado del ciclo celular a otro.

Proteínas quinasas y la regulación del ciclo celular

Tres abordajes experimentales diferentes contribuyeron a identificar las moléculas clave responsables de la regulación del ciclo celular. La primera de estas líneas de investigación tenía como base los estudios con oocitos de rana (**Fig. 17.8**). Estos oocitos se detienen en la fase G_2 del ciclo celular hasta que se estimulan por hormonas (progesterona), lo que induce su entrada en la fase M de la meiosis (que se tratará posteriormente en este capítulo). En 1971, dos grupos de trabajo independientes (Yoshio Masui y Clement Markert, así como Dennis Smith y Robert Ecker), descubrieron que se podía inducir a los oocitos detenidos en la fase G_2 a entrar en la fase M mediante la microinyección del citoplasma de oocitos que hubieran sido estimulados hormonalmente. Por tanto, parecía que un factor citoplasmático presente en los oocitos tratados con hormonas era suficiente para inducir la transición de G_2 a M en aquellos oocitos que no habían sido expuestos a las hormonas. Debido a que la entrada de los oocitos en meiosis se conoce como maduración de los oocitos, a este factor citoplasmático se le denominó **factor promotor de la maduración (MPF)**. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la actividad del MPF no se restringe a provocar la entrada de los oocitos en meiosis. Por el contrario, el MPF también se encuentra en las células somáticas, donde induce la entrada a la fase M del ciclo mitótico. Por tanto, parecía que MPF, en vez de ser específico de los oocitos, era un regulador general del paso de G_2 a M.

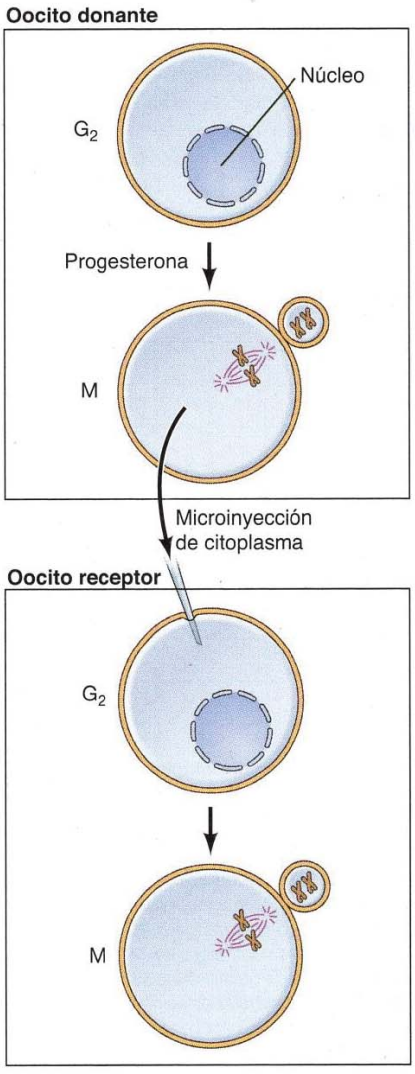
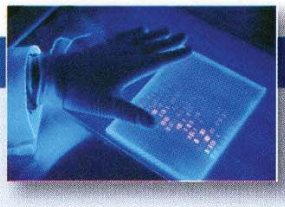


FIGURA 17.8 Identificación del MPF. Los oocitos de rana se detienen en la fase G_2 del ciclo celular, y la hormona progesterona provoca su entrada en la fase M de la meiosis. En el experimento que aquí se ilustra, a los oocitos detenidos en G_2 (recipiente de oocitos) se les microinyectó citoplasma extraído de oocitos que habían sufrido la transición de G_2 a M (donante de oocitos). Esta transferencia citoplasmática indujo el paso de G_2 a M en ausencia del estímulo hormonal, lo que demostraba que era suficiente un factor citoplasmático (MPF) para inducir la entrada en la fase M de la meiosis.



EXPERIMENTO CLAVE

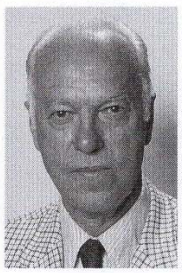
Descubrimiento del MPF

Control citoplasmático del comportamiento nuclear durante la maduración meiótica de los oocitos de rana

Yoshio Masui y Clement L. Markert
Yale University, New Haven, CT

Journal of Experimental Zoology, 1971, Volumen 177, págs. 129-146

Yoshio Masui



Clement Markert

Contexto

Los trasplantes nucleares y los experimentos de fusión nuclear llevados a cabo en los años 60 indicaban que los núcleos transferidos a las células en diferentes estados del ciclo celular mitótico adoptaban el comportamiento de la célula huésped. Por tanto, parecía ser que la actividad mitótica del núcleo era regulada por el citoplasma. Sin embargo, el postulado de la existencia de factores citoplasmáticos que controlaban la actividad mitótica del núcleo requería demostrarse mediante un abordaje experimental directo. Esta demostración la proporcionaron los estudios de Masui y Markert, que investigaron el papel de los factores citoplasmáticos en la regulación del comportamiento nuclear durante la meiosis de los oocitos de rana.

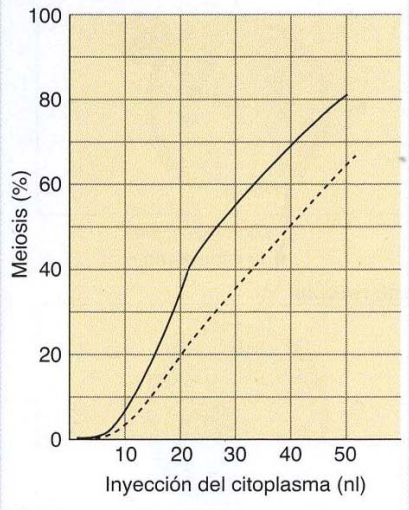
Varias características de la meiosis de los oocitos de rana sugerían que esta era controlada por factores citoplasmáticos. Concretamente, la meiosis de los oocitos de rana se detiene al final de la profase de la meiosis I. El tratamiento con la hormona progesterona provoca la reanudación de la meiosis, lo que equivale al paso de G_2 a M en las células somáticas. Entonces los oocitos sufren una segunda parada en la metafase de la meiosis II, donde permanecen hasta la fecundación. Masui y Markert propusieron la hipótesis de que tanto los efectos en la meiosis del tratamiento hormonal como los de la fecundación se debían a variaciones en el citoplasma que controlaban de manera indirecta el comportamiento del núcleo. Comprobaron directamente esta hipótesis transfiriendo el citoplasma de los oocitos estimulados con hormonas a los oocitos que no habían sido estimulados. Estos experimentos demostraron que un factor citoplasmático, que Masui y Markert denominaron factor promotor de la maduración (MPF), es el responsable de la inducción de la meiosis tras el tratamiento hormonal.

Experimentos

Debido a su gran tamaño y a su capacidad de sobrevivir a la inyección mediante micropipetas de cristal, los oocitos de rana constituían un sistema experimental adecuado para comprobar la actividad de los factores citoplasmáticos. El diseño básico de los experimentos de Masui y Markert consistía en quitar el citoplasma de los oocitos donantes que habían sido tratados con progesterona para inducir la reanudación de la meiosis. Cantidades variables de este citoplasma se inyectaron en oocitos receptores que no habían sido tratados. El resultado clave fue que el citoplasma de los oocitos donantes que había sido retirado seis o más horas después del tratamiento hormonal indujo la reanudación de la meiosis en los receptores inyectados (véase figura). Por el contrario, la inyección del citoplasma de oocitos control que no habían sido expuestos a la progesterona no tuvo efecto sobre los receptores. Por tanto, parecía que los oocitos tratados con hormonas contenían un factor citoplasmático que podía inducir la reanudación de la meiosis en aquellos receptores que nunca habían sido expuestos a la progesterona.

Los experimentos de control permitieron desechar la posibilidad de que fuera la propia progesterona el factor inductor de la meiosis en el citoplasma donante. En concreto, se demostró que la inyección de progesterona en oocitos receptores no inducía la meiosis. Sólo la aplicación externa de la hormona es eficaz, lo que indica que la progesterona actúa sobre un receptor celular de la superficie activando a un factor citoplasmático diferente. Experimentos similares realizados independientemente por Dennis Smith y Robert Ecker en 1971 condujeron a la misma conclusión.

Es de destacar que la acción de la progesterona en este sistema difiere de su acción en la mayoría de las células, donde difunde a través de la membrana plasmática y se une a un receptor intracelular (véase Cap. 16). Sin embargo, en los oocitos la progesterona



Los oocitos receptores se inyectaron con las cantidades que se indican de citoplasma de oocitos que habían sido tratados con progesterona. El citoplasma donante se obtuvo de la región central del oocito con una micropipeta (línea continua) o a partir de un homogeneizado de oocitos enteros (línea discontinua). Los resultados se presentan como el porcentaje de oocitos inyectados en los que se indujo la reanudación de la meiosis.

EXPERIMENTO CLAVE

actúa claramente sobre la superficie celular, activando un factor diferente en el citoplasma del oocito. Puesto que la reanudación de la meiosis del oocito se conoce comúnmente como la maduración del oocito, Masui y Markert acuñaron el término «factor promotor de la maduración» para el regulador de la meiosis recién descubierto.

Impacto

Tras su descubrimiento en los oocitos de rana, también se encontró el MPF en las células somáticas, donde induce el paso de G_2 a M en la mitosis. Por tanto, el MPF parecía ser un regulador general de la entrada a la fase M tanto en el ciclo celular meiótico como mitótico. La purificación definitiva del MPF de oocitos de rana en 1988, la genética de levaduras y los estudios en embriones de erizo de mar, convergieron para revelar la identidad de este regulador fundamental del ciclo celular. A saber, el MPF resultó ser un dímero constituido por la ciclina B y la proteína quinasa Cdk1. Estudios posteriores han establecido que tanto la ciclina B como Cdk1 son miembros de familias grandes de proteínas; diferentes ciclinas y proteína quinasas relacionadas con Cdk1 funcionan de manera análoga a MPF en la regulación de otros pasos del ciclo celular. Por tanto, el descubrimiento de MPF en los oocitos de rana abrió el camino a la comprensión del aparato regulador del ciclo celular que se conserva en todos los eucariotas.

El segundo abordaje para comprender la regulación del ciclo celular fue el análisis genético de levaduras, del cual fueron pioneros Lee Hartwell y cols. a principios de los años 70. Estudiando la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, estos investigadores identificaron mutantes sensibles a la temperatura que eran defectuosos en la progresión del ciclo celular. La característica principal de estos mutantes (denominados *cdc* por mutantes del *c*iclo de *d*ivisión *c*elular) era que se detenía su crecimiento en determinados puntos del ciclo celular. Por ejemplo, un mutante particularmente importante designado como *cdc28* detenía el ciclo celular en START, lo que indicaba que se necesitaba la proteína *cdc28* para rebasar este punto crítico de regulación en G_1 (**Fig. 17.9**). Paul Nurse y cols. aislaron una colección similar de mutantes del ciclo celular en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Entre estos mutantes se encontraba *cdc2*, que detenía el ciclo celular de *S. pombe* tanto en G_1 como en el paso de G_2 a M (que es el principal punto de regulación en la levadura de fisión). Estudios posteriores mostraron que

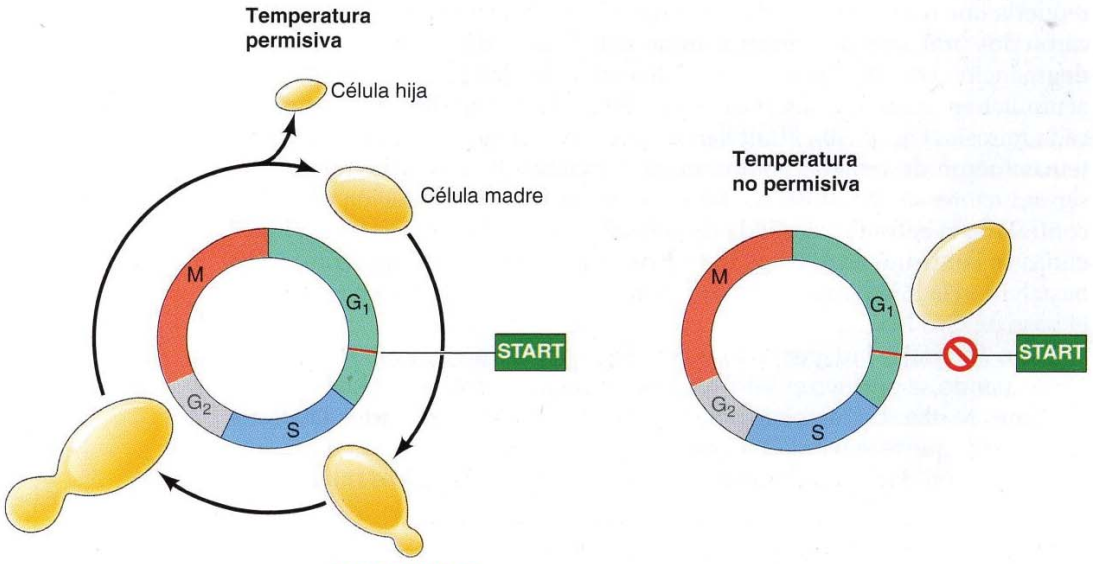


FIGURA 17.9 Propiedades de los mutantes *cdc28* de *S. cerevisiae*. El mutante sensible a la temperatura *cdc28* se replica normalmente a la temperatura permisiva. Sin embargo, a la temperatura no permisiva la progresión a través del ciclo celular se bloquea en START.

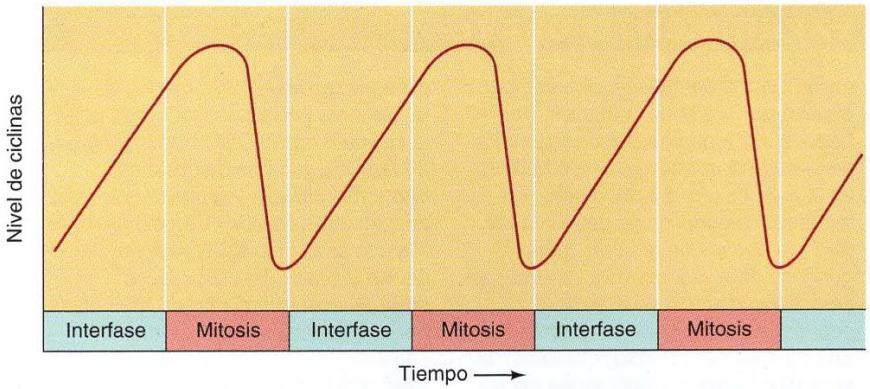


FIGURA 17.10 Acumulación y degradación de ciclinas en los embriones del erizo de mar. Las ciclinas fueron identificadas como proteínas que se acumulaban durante la interfase y se degradaban rápidamente hacia el final de la mitosis.

◆ Algunos de los mutantes del ciclo celular de *S. pombe*, aislados por Paul Nurse y sus colaboradores en la Universidad de Edimburgo, fueron identificados porque las células se dividían cuando eran más pequeñas en tamaño de lo normal. Estos mutantes fueron denominados Wee, el término escocés para pequeño.

cdc28 de *S. cerevisiae* y *cdc2* de *S. pombe* son genes funcionalmente homólogos, que se requieren para atravesar START así como para entrar en mitosis en ambas especies de levaduras. Estudios posteriores demostraron que *cdc2* y *cdc28* codifican una proteína quinasa —la primera indicación de un papel prominente de la fosforilación proteica en la regulación del ciclo celular—. Adicionalmente, genes relacionados fueron identificados en otros eucariotas, incluidos en el hombre. La proteína quinasa codificada por los genes de levadura *cdc2* y *cdc28* ha demostrado ser un regulador conservado del ciclo celular en todos los eucariotas, conocido como **Cdk1**.

Por último, la tercera línea de investigación, que convergía con la identificación del MPF y con la genética de levaduras, vino de estudios sobre la síntesis de proteínas en embriones tempranos de erizo de mar. Tras la fecundación, estos embriones sufren una serie de divisiones celulares rápidas. Sorprendentemente, los estudios con inhibidores de la síntesis de proteínas mostraban que la entrada en la fase M en estos ciclos celulares embrionarios requería una nueva síntesis de proteínas. En 1983, Tim Hunt y cols. identificaron dos proteínas que mostraban un patrón periódico de acumulación y degradación en embriones de erizo de mar y de almeja. Estas proteínas se acumulaban durante la interfase y eran degradadas rápidamente al final de cada mitosis (**Fig. 17.10**). Hunt llamó a estas proteínas **ciclinas** (las dos proteínas fueron designadas como ciclina A y ciclina B) y sugirió que podían ser inductores de la mitosis, y que su acumulación y degradación periódica controlaría la entrada y la salida de la fase M. El papel propuesto para las ciclinas se confirmó en 1986 cuando Joan Ruderman y cols. mostraron que bastaba con la microinyección de la ciclina A en oocitos de rana para inducir el paso de G_2 a M.

Estos abordajes independientes convergieron de manera espectacular en 1988, cuando se purificó el MPF a partir de oocitos de rana en el laboratorio de James Maller. La caracterización molecular del MPF en varios laboratorios mostró que este regulador conservado del ciclo celular está compuesto por dos subunidades fundamentales: Cdk1 y ciclina B (**Fig. 17.11**). La ciclina

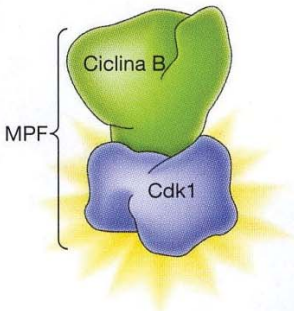


FIGURA 17.11 Estructura del MPF. El MPF es un dímero constituido por la ciclina B y por la proteína quinasa Cdk1. La ciclina B es necesaria para la actividad catalítica de Cdk1.

B es una subunidad reguladora que se requiere para la actividad catalítica de la proteína quinasa Cdk1, lo que concuerda con el hecho de que la actividad de MPF está controlada por la acumulación y degradación periódica de la ciclina B durante el transcurso del ciclo celular.

Diversos estudios posteriores han confirmado este papel de la ciclina B, así como la regulación del MPF mediante la fosforilación y la desfosforilación de Cdk1 (**Fig. 17.12**). En las células de mamífero, la ciclina B es sintetizada y forma complejos con Cdk1 durante G_2. A medida que se forman estos complejos, la Cdk1 es fosforilada en dos posiciones reguladoras críticas. Una de estas fosforilaciones ocurre en la treonina-161 y es necesaria para la actividad de la Cdk1 quinasa. La segunda es una fosforilación de la tirosina-15 y de la proteína quinasa adyacente Wee1, que inhibe la actividad de Cdk1 y da lugar a la acumulación de complejos de Cdk1/ciclina inactivos durante la fase G_2. La transición de G_2 a M se produce a continuación mediante la activación del complejo Cdk1/ciclina B como resultado de la defosforilación de la treonina-14 y tirosina-15 por la acción de una proteína fosfatasa denominada Cdc25.

Una vez activada, la proteína quinasa Cdk1 fosforila varias proteínas diana que inician la fase M, lo que se tratará posteriormente en este capítulo. Además, la actividad de Cdk1 provoca la degradación de la ciclina B, que se produce por una proteólisis mediada por ubiquitina. La ubiquitilación de la ciclina B está mediada por una ubiquitina ligasa denominada **complejo de promoción de anafase/ciclosoma (APC/C)**, que es activada

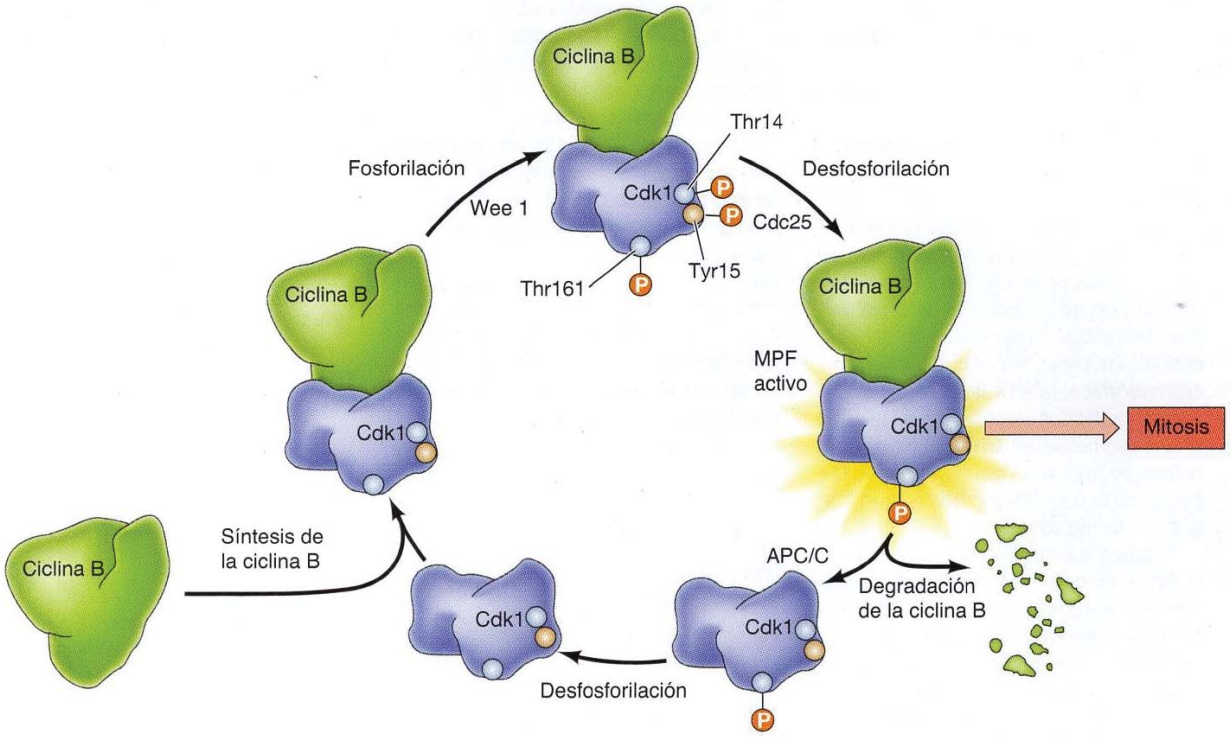
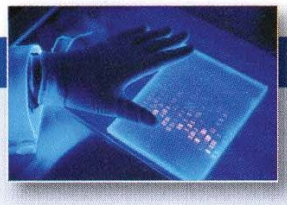


FIGURA 17.12 Regulación del MPF. Cdk1 forma complejos con la ciclina B durante G_2. Entonces Cdk1 es fosforilada en la treonina-161 (Thr161), que se requiere para su actividad, y en la tirosina-15 (Tyr15) (y en la treonina-14 (Thr14) en células de vertebrados), lo que inhibe la actividad de Cdk1. La desfosforilación de la Tyr-15 y de la Thr-14 activa a MPF para el paso de G_2 a M. La actividad de MPF termina hacia el final de la mitosis por la degradación proteolítica de la ciclina B, seguida de la desfosforilación de Cdk1.



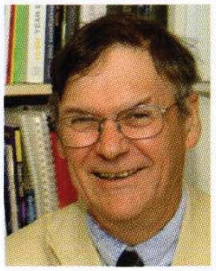
EXPERIMENTO CLAVE

La identificación de la ciclina

Ciclina: una proteína determinada por el ARNm materno en los oocitos de erizo de mar que es destruida con cada escisión de la división

Tom Evans, Eric T. Rosenthal, Jim Youngblom, Dan Distel, y Tim Hunt
Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA

Cell, 1983, Volumen 33, págs. 389-396



Tim Hunt

Contexto

Tim Hunt y cols. analizaron la síntesis proteica en los oocitos de erizo de mar después de la fertilización, con la meta de identificar proteínas recién sintetizadas que pudieran ser necesarias para la división celular durante el desarrollo embrionario. Una diversidad de experimentos anteriores habían demostrado que la traducción de ARNm maternos almacenados en los oocitos sin fertilizar estaba activada por la fertilización, dando lugar a cambios llamativos en el perfil de síntesis proteica después de la fertilización. Adicionalmente, los estudios con inhibidores de la traducción habían establecido que la síntesis proteica era necesaria para la división celular durante el desarrollo embrionario temprano. Por ejemplo, la inhibición de la síntesis proteica después de la fertilización de los oocitos de erizo de mar bloqueaba la degradación de la envuelta nuclear, la condensación cromosómica, la formación del huso. Estos resultados sugerían que las divisiones celulares embrionarias requerían proteínas que eran sintetizadas a partir de ARNm maternos en los oocitos fertilizados.

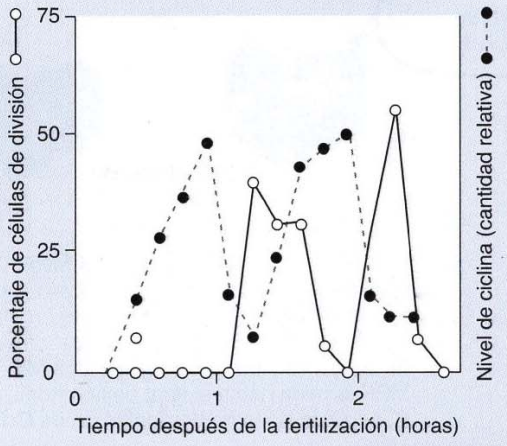
Mediante estudios de síntesis proteica en oocitos fertilizados, Hunt y cols. esperaban, por tanto, identificar proteínas recién sintetizadas que estuviesen implicadas en la división celular. Sus experimentos dieron lugar a la identificación de las ciclinas y a la dilucidación del mecanismo fundamental que dirige el ciclo de división de las células eucariotas.

Experimentos

Oocitos de erizo de mar fertilizados y sin fertilizar fueron incubados en presencia de metionina radioactiva, y los extractos celulares fueron analizados mediante electroforesis en gel para identificar proteínas recién sintetizadas. Se encontró que diversas proteínas prominentes eran sintetizadas en los oocitos fertilizados, tal y como se había descrito en los oocitos de otros organismos. Adicionalmente, un análisis exhaustivo del perfil de las proteínas marcadas radiactivamente en diferentes momentos después de la fertilización, dio un resultado sorprendente. Mediante el análisis de las proteínas presentes en intervalos de tiempo de 10 minutos, después de la fertilización, Hunt y cols. identificaron una proteína que era prominente en oocitos recién fertilizados, pero que prácticamente desaparecía 85 minutos después de la fertilización. Esta proteína se hacía abundante de nuevo 95 minutos después de la fertilización, y desaparecía de nuevo 30 minutos más tarde. Debido a estas oscilaciones cíclicas en su abundancia, la proteína se denominó «ciclina».

Otro resultado llamativo era el obtenido cuando las oscilaciones de los niveles de ciclina eran comparados con las divisiones celulares durante el desarrollo de los embriones de erizo (véase figura). La primera división del oocito fertilizado tuvo lugar 85 minutos después de la fertilización, coincidiendo con el declive de los niveles de ciclina.
Los niveles de ciclina aumentaban a continuación después de la primera división celular, y declinaban de nuevo 125 minutos después de la fertilización, lo que coincidía con un segundo ciclo de división celular embrionaria.
Experimentos adicionales demostraron que la ciclina era continuamente sintetizada después de la fertilización, pero era rápidamente degradada antes de cada división celular.

(Continúa en la página siguiente)



Oocitos de erizo de mar fueron fertilizados y metionina radioactiva fue añadida 5 minutos después de la fertilización. Las muestras fueron recogidas a intervalos de 10 minutos y analizadas mediante electroforesis en gel para determinar los niveles de ciclina. En paralelo, las muestras fueron examinadas microscópicamente para cuantificar el porcentaje de células que sufrían división celular.

EXPERIMENTO CLAVE

Impacto

Basándose en su degradación periódica, coincidente con el comienzo de la división celular embrionaria, Hunt y cols. concluyeron que era «difícil creer que el comportamiento de las ciclinas no esté conectado con los procesos implicados en la división celular». Sin embargo, en la ausencia de experimentos que demostrasen la actividad biológica de la ciclina, no poseían pruebas directas para esta conclusión. No obstante, se sabía que la actividad de MPF oscilaba de forma similar durante el ciclo celular, y experimentos adicionales demostraron que la formación de MPF activa requería síntesis proteica. Estas similitudes entre MPF y la ciclina llevaron a Hunt y cols. a sugerir una relación directa entre MPF, definida como una actividad biológica, y la ciclina, definida como una proteína cuyos niveles oscilaban durante la progresión del ciclo celular.

Experimentos posteriores de Joan Ruderman y cols. demostraron que la inyección de ciclina era suficiente para inducir la entrada de los oocitos de rana en meiosis, demostrando que la ciclina poseía la actividad biológica de MPF. La relación biológica entre la ciclina y MPF fue establecida a continuación mediante la purificación de MPF a partir de oocitos de rana en el laboratorio de James Maller y la caracterización consiguiente de MPF como un dímero de ciclina B y Cdk1. La degradación periódica de la ciclina B, descubierta por Tim Hunt y cols., controla la actividad de Cdk1 durante la entrada y salida de mitosis. Adicionalmente, otras ciclinas juegan papeles similares en la regulación de transiciones entre otras fases del ciclo celular. El descubrimiento de la ciclina como una proteína oscilante en los embriones del erizo de mar fue, por tanto, la clave de la dilucidación de la base molecular de la regulación del ciclo celular.

ANIMACIÓN 17.4

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.4

Ciclinas, Cdk y el ciclo celular. El factor promotor de la maduración (MPF) —formado por la ciclina B y Cdk1— regula la transición desde la fase G_2 a la M del ciclo celular.

como consecuencia de la fosforilación por Cdk1/ciclina B. La resultante destrucción proteolítica de la ciclina B inactiva a Cdk1, lo que lleva a la célula a salir de la mitosis, a sufrir la citocinesis, y a volver a la interfase. Como se indica en las secciones posteriores, la ubiquitina ligasa APC/C desempeña un papel fundamental en la progresión del ciclo celular al degradar las ciclinas y otras proteínas reguladoras clave no sólo en la fase M, sino también durante otras fases del ciclo celular.

Familias de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

La estructura y función de MPF (Cdk1/ciclina B) no sólo proporciona una base molecular para comprender la entrada y salida de la fase M, sino también las bases para dilucidar la regulación de otros pasos del ciclo celular. La información que proporcionó la caracterización del complejo Cdk1/ciclina B ha tenido un profundo impacto en la comprensión de la regulación del ciclo celular. En concreto, investigaciones posteriores han establecido que tanto Cdk1 como la ciclina B son miembros de grandes familias de proteínas relacionadas, en las que los diferentes miembros de estas familias controlan la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular.

Como ya se trató anteriormente, Cdk1 controla el paso a través de START así como la entrada en mitosis en las levaduras. Sin embargo, esto lo hace en asociación con diferentes ciclinas (**Fig. 17.13**). Concretamente, la transición de G_2 a M la lleva a cabo Cdk1 junto con las ciclinas mitóticas de tipo B (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4). Sin embargo, el paso a través de START lo controla Cdk1 en asociación con una clase diferente de ciclinas denominadas **ciclinas G_1** o **Cln's**. Entonces Cdk1 se asocia con un tipo diferente de ci-

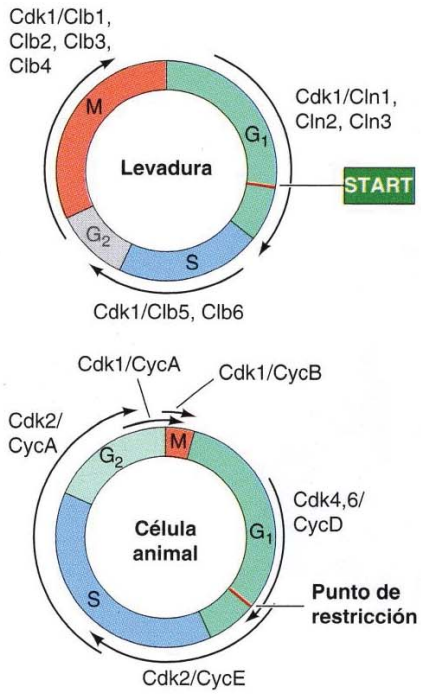


FIGURA 17.13 Complejos de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclinas. En las levaduras, el paso a través de START lo controla Cdk1 asociado a las ciclinas G_1 (Cln1, Cln2, Cln3). Los complejos de Cdk1 con diferentes ciclinas tipo B (Clb) regulan la progresión a través de la fase S y la entrada en la mitosis. En las células animales, el paso a través del punto de restricción de G_1 es controlado por complejos de Cdk4 y Cdk6 con ciclinas del tipo D. Los complejos Cdk2/ciclina E intervienen más adelante en G_1 y se requieren para el paso de G_1 a S. Los complejos Cdk2/ciclina A se requieren para la progresión a través de la fase S. Los complejos Cdk1/ciclina A regulan la progresión hasta G_2, y los complejos Cdk1/ciclina B dirigen la transición de G_2 a M.

clinas B (Clb5 y Clb6), que se requieren para la progresión a través de la fase S. Estas asociaciones de Cdk1 con diferentes ciclinas del tipo B y G_1 provocan la fosforilación por Cdk1 de diferentes proteínas sustrato, lo que se requiere para la progresión a través de las fases específicas del ciclo celular.

Los ciclos celulares de los eucariotas superiores se controlan, no solamente por múltiples ciclinas, sino también por múltiples proteína quinasas relacionadas con Cdk1, que se conocen como **Cdk**, de quinasas dependientes de ciclina. Todos estos miembros de la familia Cdk se asocian con ciclinas específicas para llevar a cabo la progresión a través de los diferentes estados del ciclo celular (véase Fig. 17.13). Por ejemplo, el paso de G_1 a S se regula principalmente por Cdk4, Cdk6 y Cdk2 en asociación con las ciclinas D y E. Los complejos de Cdk4 y Cdk6 con las ciclinas de tipo D (ciclina D1, D2 y D3) desempeñan un papel crítico en la progresión a través del punto de restricción en G_1. Las ciclinas de tipo E (E1 y E2) se expresan y los complejos Cdk2/ciclina E se requieren para el paso de G_1 a S y el inicio de la síntesis del ADN. Los complejos de Cdk2 con ciclinas de tipo A (A1 y A2) son activados más adelante en la fase S y actúan a través de G_2. El inicio de la mitosis y el paso a través de la fase M son activados entonces por Cdk1 en complejos con ciclinas del tipo A y B (B1, B2 y B3).

A pesar de que los distintos complejos Cdk/ciclina suelen actuar en fases diferentes del ciclo celular, en los trabajos sobre proteínas Cdk y ciclinas en ratones modificados genéticamente se ha observado un nivel muy alto de plasticidad, de modo que las distintas ciclinas y Cdk pueden compensar la pérdida de otras en ratones mutantes. Es más, se ha demostrado que las células que carecen todas las Cdk que actúan normalmente en la interfase (Cdk4, Cdk6 y Cdk2) son capaces de proliferar. El análisis de estas células ha revelado que, en ausencia de otras Cdk, Cdk1 se une a todas las ciclinas y puede dirigir la progresión del ciclo celular en cualquiera de sus etapas. Por el contrario, los ratones que carecen de Cdk1 no son viables. En consecuencia, Cdk1 sería la única Cdk imprescindible en las células de mamífero (y de levadura) que puede sustituir a las demás en caso de estar ausentes.

La actividad de las Cdk durante la progresión del ciclo celular se regula por, al menos, cuatro mecanismos moleculares (**Fig. 17.14**). Como ya se ha tratado en el caso de Cdk1, el primer nivel de regulación implica la asociación de las Cdk con las ciclinas correspondientes. Así, la formación de los complejos específicos Cdk/ciclina está controlada por la síntesis y degradación de las ciclinas. En segundo lugar, la activación de los complejos Cdk/ciclina requiere la fosforilación de un residuo de treonina de la Cdk conservado alrededor de la posición 160. Esta fosforilación que activa la Cdk está catalizada por una enzima denominada CAK (de quinasa activadora de Cdk), que a su vez está constituida por una Cdk (Cdk7) unida con la ciclina H. Los complejos de Cdk7 y ciclina H se asocian con el factor de transcripción TFIIH, que se requiere para la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II (véase Cap. 8), de forma que este miembro de la familia Cdk participa en la transcripción además de en la regulación del ciclo celular.

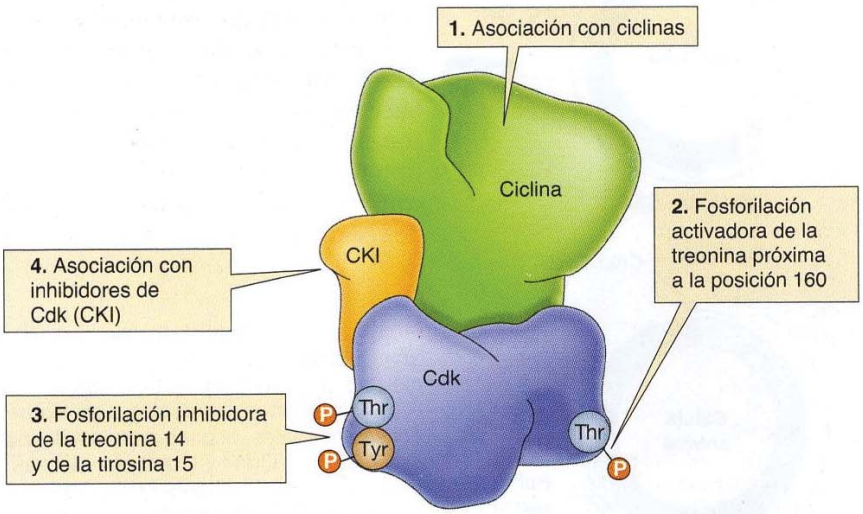


FIGURA 17.14 Mecanismos de regulación de Cdk. Las actividades de las Cdk se regulan por cuatro mecanismos moleculares.

TABLA 17.1 Inhibidores de Cdk

Inhibidor	Complejo Cdk/ciclina	Fase afectada del ciclo celular
Familia Ink4 (p15, p16, p18, p19)	Cdk4 y Cdk6	G_1
Familia Cip/Kip (p21, p27, p57)	Cdk2/ciclina E	G_1
	Cdk2/ciclina A	S, G_2

A diferencia de la fosforilación activadora producida por CAK, el tercer mecanismo de la regulación de Cdk (que solo afecta a Cdk1 y Cdk2) implica la fosforilación inhibidora de residuos de tirosina cerca del extremo amino terminal de Cdk, que está catalizada por la proteína quinasa Wee1. Ambas, Cdk1 como Cdk2, se inhiben por la fosforilación de la tirosina-15, y en el caso de los vertebrados, de la treonina-14 adyacente. Estas Cdk se activan por la desfosforilación de estos residuos por miembros de la familia Cdc25 de proteína fosfatasas.

Además de la regulación de las Cdk mediante fosforilación, sus actividades también están controladas por la unión de proteínas inhibidoras (denominadas **inhibidores de Cdk** o **CKIs**). En las células de mamífero, existen dos familias de inhibidores de Cdk que son responsables de la regulación de las diferentes Cdk (**Tabla 17.1**). Los miembros de la familia Ink4 se unen específicamente e inhiben a Cdk4 y Cdk6, de modo que los Ink4 CKI actúan para inhibir la progresión a través del punto de restricción en G_1. Por el contrario, los miembros de la familia Cip/Kip se unen a las ciclinas y suelen inhibir la formación de complejos de Cdk2 con ciclina A o ciclina E, por lo que entran en la fase S e impiden la progresión de las fases S y G_1 del ciclo celular. Por ello, el control de las proteínas Ink4 y Cip/Kip supone un mecanismo adicional de regulación de la actividad de las Cdk. Los efectos combinados de todos estos tipos de regulación de Cdk son los responsables del control de la progresión del ciclo celular en respuesta tanto a los puntos de control como a la variedad de los estímulos extracelulares que regulan la proliferación celular.

Factores de crecimiento y la regulación de las Cdk de G_1

Como ya se trató anteriormente, la proliferación de las células animales se regula principalmente mediante diversos factores de crecimiento extracelulares que controlan la progresión de las células a través del punto de restricción en las postrimerías de G_1. En ausencia de los factores de crecimiento las células son incapaces de rebasar el punto de restricción y, en lugar de ello, se inactivan, con lo que suelen entrar en el estado de reposo denominado G_0; desde éste pueden volver a entrar en el ciclo celular al ser estimuladas por los factores de crecimiento. Este control de la progresión del ciclo celular mediante los factores de crecimiento extracelulares implica que las vías de la señalización intracelular que se activan posteriormente (*downstream*) a los receptores de los factores de crecimiento (que se trataron en el capítulo anterior) intervienen, en última instancia, regulando los componentes de la maquinaria del ciclo celular.

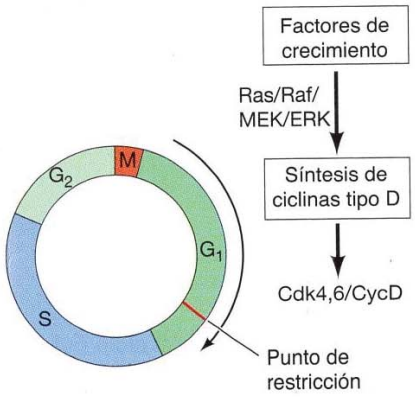


FIGURA 17.15 Inducción de las ciclinas tipo D. Los factores de crecimiento regulan la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción de G_1 induciendo la síntesis de ciclinas tipo D mediante la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK (véanse Figs. 16.28 y 16.29).

Un vínculo importante entre la señalización por los factores de crecimiento y la progresión del ciclo celular son las ciclinas del tipo D (**Fig. 17.15**). La síntesis de la ciclina D se induce en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento, como resultado de la señalización a través de la vía Ras/Raf/MEK/ERK, y la ciclina D sigue siendo sintetizada mientras los factores de crecimiento están presentes. Sin embargo, las ciclinas de tipo D también se degradan rápidamente durante G_1 como consecuencia de la ubi-

quitilación por la ubiquitina ligasa APC/C, por lo que su concentración intracelular desciende bruscamente en ausencia de los factores de crecimiento. Así, mientras los factores de crecimiento estén presentes durante G_1, los complejos de Cdk4, 6/ciclina D hacen que las células atraviesen el punto de restricción. Por otro lado, si se eliminan los factores de crecimiento antes de este punto, los niveles de ciclina D descienden rápidamente, y las células no pasan a través de G_1 a S; por el contrario, se inactivan y entran en G_0. Por tanto, la inducción y el rápido recambio de las ciclinas tipo D1 vinculan la señalización por factores de crecimiento con la maquinaria del ciclo celular, lo que permite a los factores de crecimiento extracelulares controlar la progresión de las células a través de G_1.

Puesto que la ciclina D es una diana importante de la señalización por factores de crecimiento, se podría esperar que las alteraciones en la regulación de la ciclina D alteraran la regulación del crecimiento celular, característica de las células cancerosas. Así, se ha encontrado que la causa de muchos cánceres humanos es una regulación defectuosa del ciclo celular, al igual que la causa de muchos otros son alteraciones en las vías de señalización intracelular activadas por los receptores de los factores de crecimiento (véase Cap. 16). Por ejemplo, las mutaciones que dan lugar a una expresión continua de la ciclina D contribuyen al desarrollo de varios tipos de cánceres humanos, entre los que se incluyen los linfomas y el cáncer de pulmón. Igualmente, las mutaciones que inactivan a los inhibidores de Cdk Ink4 que se unen a Cdk4 y Cdk6 se encuentran habitualmente en células cancerosas humanas.

La relación entre la ciclina D, el control del crecimiento celular, y el cáncer se ve reforzada por el hecho de que una proteína sustrato de los complejos Cdk4, 6/ciclina D aparece mutada en varios tumores humanos. Esta proteína, denominada **Rb**, se identificó como el producto de un gen responsable del retinoblastoma, un tipo de tumor de ojo infantil hereditario poco frecuente (véase Cap. 19). Estudios posteriores mostraron que las mutaciones que ocasionan la ausencia de la proteína Rb funcional, no sólo se encuentran en el retinoblastoma sino en diversos cánceres humanos más comunes. Rb es el prototipo de un **gen supresor de tumores** —un gen cuya inactivación conduce al desarrollo de un tumor—. Mientras que las proteínas oncogénicas como Ras (véase Cap. 16) y la ciclina D provocan la proliferación celular, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores (incluyendo Rb y los inhibidores Dck Ink4) funcionan como frenos que ralentizan la progresión del ciclo celular.

Estudios subsiguientes han demostrado que Rb y miembros relacionados de la familia Rb juegan un papel clave en el acoplamiento de la maquinaria del ciclo celular a expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular y la síntesis de ADN (**Fig. 17.16**). La actividad de Rb se regula mediante cambios en su fosforilación a medida que las células avanzan por el ciclo. Concretamente, Rb es fosforilada por los complejos Cdk4, 6/ciclina

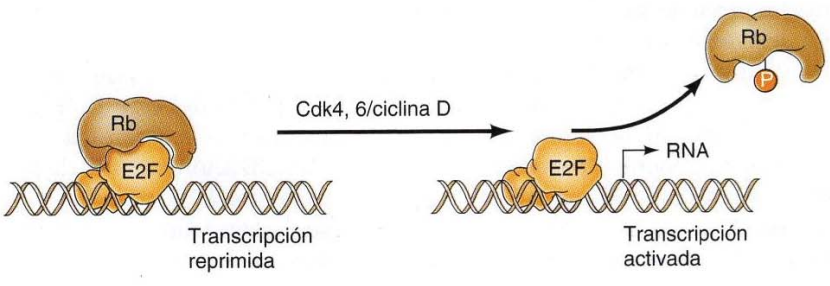


FIGURA 17.16 Regulación del ciclo celular por Rb y E2F. En su estado poco fosforilado, Rb se une a miembros de la familia E2F reprimiendo la transcripción de los genes regulados por E2F. La fosforilación de Rb por los complejos Cdk4, 6/ciclinaD provoca su disociación de E2F en la fase G_1 avanzada. Entonces E2F activa la expresión de sus genes diana, que codifican proteínas necesarias para la continuación del ciclo celular.

D a medida que las células rebasan el punto de restricción en G_1. En su estado poco fosforilado (en G_0 o en G_1 temprana), Rb se une a los miembros de la familia de los factores de transcripción **E2F**, que regulan la expresión de varios genes relacionados con la progresión del ciclo celular, incluyendo al gen que codifica para la ciclina E. E2F se une a sus secuencias diana tanto en presencia como en ausencia de Rb. Sin embargo, Rb actúa como un represor, de tal manera que el complejo Rb/E2F impide que se transcriban los genes regulados por E2F. La fosforilación de Rb por los complejos Cdk4, 6/ciclina D provoca que el Rb fosforilado se disocie de E2F, lo que activa la transcripción de sus genes diana. Por tanto, Rb interviene como un interruptor molecular que convierte a E2F de un represor a un activador de los genes requeridos para la progresión del ciclo celular. Por su parte, el control de Rb a través de la fosforilación por Cdk4, 6/ciclina D acopla esta regulación de la expresión génica a la disponibilidad de factores de crecimiento en G_1.

La progresión a lo largo del punto de restricción y la entrada en la fase S está mediada por la activación de complejos de Cdk2/ciclina E (**Fig. 17.17**). Esto resulta en parte de la síntesis de ciclina E, que es estimulada por E2F después de la fosforilación de Rb (véase Fig. 17.16). Adicionalmente, la actividad de Cdk2/ciclina E es inhibida en G_0 o temprano en G_1, mediante el inhibidor de Cdk, p27 (véase Tabla 17.1). Esta inhibición de Cdk2 por p27 es eliminada mediante múltiples mecanismos a medida que la célula progresa a través de G_1. En primer lugar, la señalización de factores de crecimiento mediante las vías Ras/Raf/MEK/ERK y PI 3-quinasa/Akt reduce la transcripción y traducción de p27, disminuyendo los niveles de p27 en el interior celular. Adicionalmente, una vez que Cdk2 se activa, cataliza la degradación completa de p27 mediante su fosforilación y dirigiéndolo hacia su ubi-

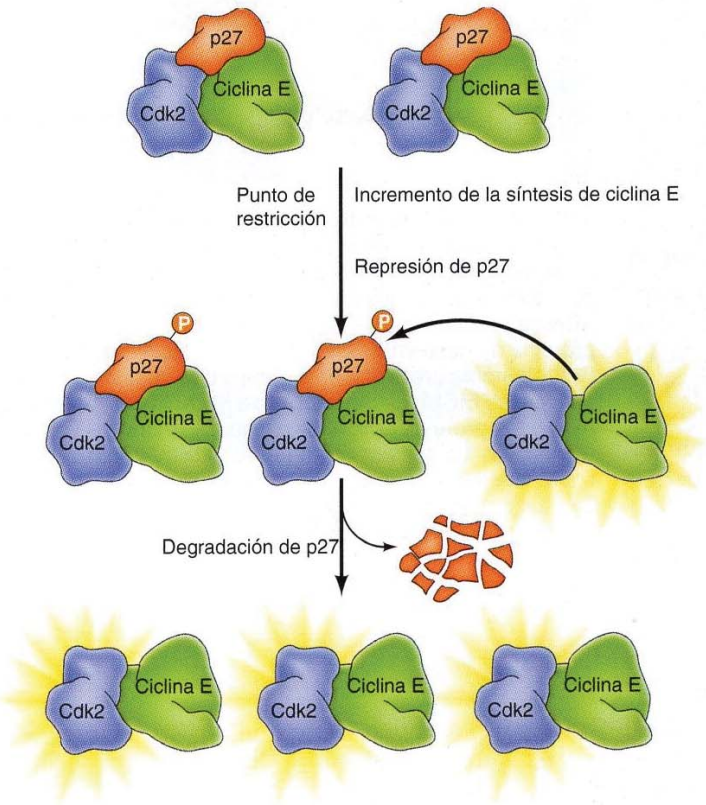


FIGURA 17.17 Activación de Cdk2/ciclina E. En la fase G_1 temprana, los complejos Cdk2/ciclina E se encuentran inhibidos por el inhibidor de Cdk p27. El paso por el punto de restricción induce la síntesis de ciclina E vía activación de E2F. Además, la señalización del factor de crecimiento inhibe la síntesis de p27. Cuando Cdk2 se activa, fosforila al p27 y lo marca para ser degradado, dando lugar a la activación plena de los complejos Cdk2/ciclina E y entrada en la fase S.

quitilación. Esta autorregulación positiva entonces resulta en la activación completa de los complejos de Cdk2/ciclina E y progresión a la fase S. La ubiquitina ligasa APC/C también es inhibida por Cdk2, con lo cual los niveles elevados de ciclinas se mantienen a través de S y G_2.

Fase S y regulación de replicación de ADN

Los complejos Cdk2/ciclina E inician la fase S activando la síntesis de ADN en los orígenes de la replicación. Como se indica en el Capítulo 7, las células de mamíferos utilizan miles de orígenes para replicar su ADN (véase Fig. 7.13). El inicio de la replicación en cada uno de estos orígenes debe controlarse minuciosamente para que cada segmento del genoma se replique una vez, y sólo una, durante la fase S de cada ciclo celular. Así, una vez que se ha replicado el segmento de ADN en la fase S, existen mecanismos de control para prevenir el reinicio de la replicación de ADN hasta que se haya completado el ciclo celular y la célula haya pasado por la mitosis. La replicación de ADN se inicia mediante la actividad de las proteínas MCM helicasa, que son reguladas por los complejos ciclina/Cdk en diferentes estadios del ciclo celular (**Fig. 17.18**). Las proteínas MCM helicasa se unen con orígenes de replicación, junto con las proteínas de complejo de reconocimiento de origen (ORC) (véase Fig. 7.15), durante G_1. Permanecen inactivas como un complejo de pre-replicación durante G_1 y se activan cuando la célula entra en la fase S. Esta activación de MCM en fase S procede de la acción de Cdk2/ciclina E, que fosforila varias proteínas de activación reclutadas en el complejo de pre-replicación. Como se ha indicado anteriormente, la activación de Cdk2/ciclina E conduce también a la inhibición de la ubiquitina ligasa APC/C. Esta inhibición de APC/C lleva a la activación de una segunda proteína quinasa, DDK, que fosforila las proteínas MCM directamente. La activación de la MCM helicasa inicia la replicación de ADN y las proteínas MCM se alejan del origen con la horquilla de replicación. La alta actividad de Cdk durante las fases S, G_2 y M evita que las proteínas MCM se vuelvan a asociar con los orígenes de replicación, de manera que los complejos de pre-replicación solamente pueden formarse de nuevo durante G_1, cuando la actividad de Cdk es baja. Así, una vez que un origen se activa durante la fase S, la replicación en ese origen no puede iniciarse nuevamente hasta que la célula pase por la mitosis y entre en la fase G_1 del siguiente ciclo celular.

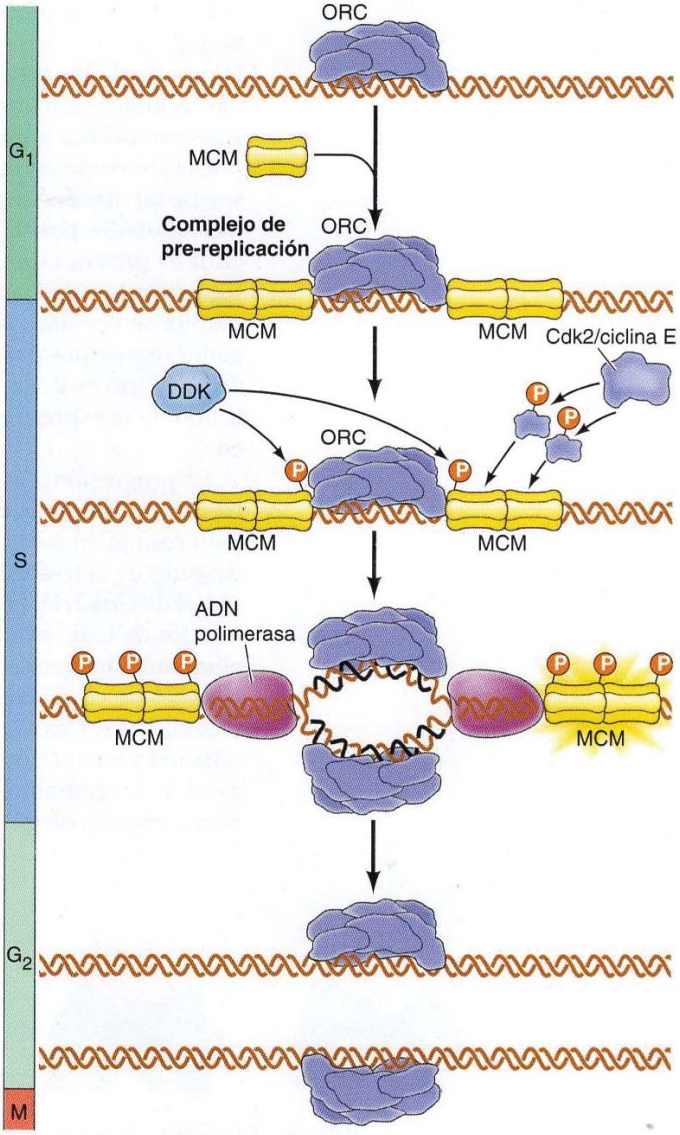


FIGURA 17.18 Inicio de replicación de ADN. Las proteínas MCM helicasa se unen a los orígenes de replicación junto con el complejo ORC (complejo de reconocimiento de origen) en G_1 para formar un complejo de pre-replicación. La replicación de ADN se inicia en la fase S por medio de la Cdk2/ciclina E y la proteína quinasa DDK. La DDK fosforila las proteínas MCM y la Cdk2 fosforila proteínas adicionales que se unen al complejo y activan las MCM. La activación de MCM inicia la replicación de ADN y las proteínas MCM se alejan del origen con la horquilla de replicación. La alta actividad de las Cdk evita que las proteínas MCM vuelvan a asociarse con los orígenes durante las fases S, G_2 y M, con lo cual los complejos de pre-replicación sólo pueden volverse a formar durante G_1.

Puntos de control de lesiones en el ADN

La proliferación celular es regulada no sólo mediante factores de crecimiento, sino también mediante una diversidad de señales que actúan para inhibir la progresión del ciclo celular. Los puntos de control de lesiones en el

ADN juegan un papel crítico en el mantenimiento de la integridad del genoma, deteniendo la progresión del ciclo celular en respuesta al ADN dañado o incompletamente replicado. Estos puntos de control, que son operativos durante las fases G_1, S, y G_2 del ciclo celular, permiten el tiempo suficiente para que se repare el daño antes de que se reanude la replicación del ADN o la división celular (véase Fig. 17.7).

En la detención del ciclo celular intervienen dos proteína quinasas relacionadas, denominadas **ATR** y **ATM**, que se activan como consecuencia de daños al ADN. ATR y ATM activan una vía de señalización que no solamente induce la detención del ciclo celular, sino también la activación de los mecanismos de reparación del ADN y, en algunos casos, la muerte celular programada. El hecho de que la identificación inicial de estas proteínas se debiera a la relación etiológica existente entre las mutaciones del gen que codifica ATM y la enfermedad ataxia telangiectasia, que da lugar a anomalías de los sistema nervioso e inmunitario, además de una elevada prevalencia de tumores en los sujetos afectados, pone de relieve la importancia que reviste esta respuesta a las lesiones en el ADN.

Tanto ATM como ATR forman parte de complejos proteicos que reconocen ADN dañado o sin replicar (**Fig. 17.19**). ATR se activa por roturas de la hebra sencilla o secuencias de ADN sin replicar, mientras que ATM lo hace fundamentalmente por roturas de la doble hebra. Tras su activación por una lesión en el ADN, ATM y ATR fosforilan y activan a las **quinasas de los puntos de control** Chk1 y Chk2, respectivamente. Chk1 y Chk2 inducen la detención del ciclo celular a través de la fosforilación y la inhibición o la inducción de la degradación de las fosfatasas Cdc25, que son necesarias para activar a Cdk2 y Cdk1 a través de la eliminación de los residuos fosforilados inhibitorios (véase Fig. 17.14) durante la progresión del ciclo celular. De este modo, las lesiones del ADN dan lugar a la inhibición de Cdk2, que in-

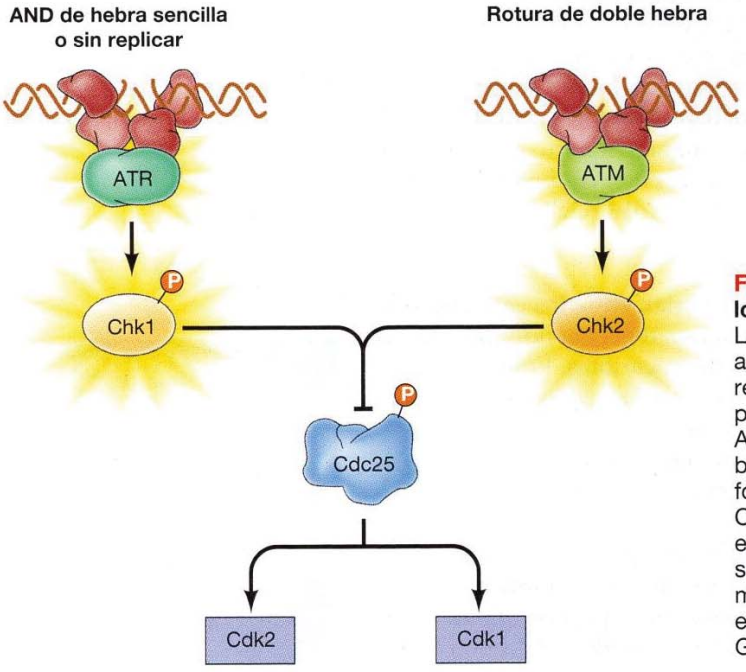


FIGURA 17.19 Detención del ciclo celular en los puntos de control de lesiones del ADN. Las proteínas quinasas ATM y ATR son activadas en complejos de proteínas que reconocen el ADN dañado. La ATR se activa por el ADN monocatenario o no replicado, y la ATM, principalmente por las roturas bicatenarias. A continuación, ATR y ATM fosforilan y activan las proteína quinasas Chk1 y Chk2, respectivamente. Chk1 y Chk2 fosforilan e inhiben a las proteína fosfatasa Cdc25, que son necesarias para activar a Cdk2 y Cdk1, de modo que su inhibición da lugar a la detención en los puntos de control de lesiones al ADN en G_1, S y G_2.

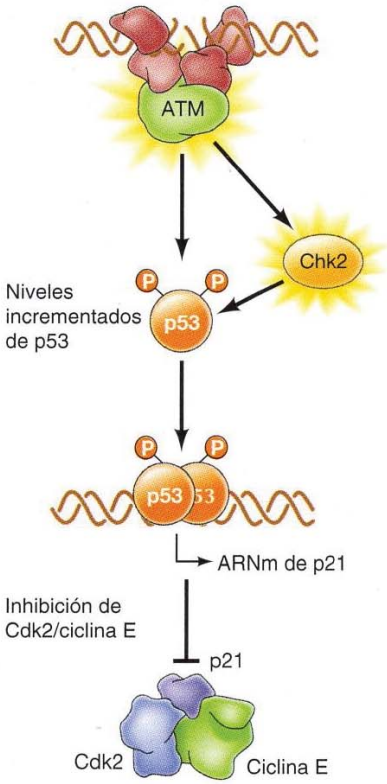


FIGURA 17.20 Papel de p53 en la detención del ciclo celular. La proteína p53 juega un papel clave en la detención del ciclo celular en el punto de control de daño del ADN en las células de mamífero. La fosforilación por parte de ATM y Chk2 estabiliza a p53, resultando en incrementos rápidos en los niveles de p53 en respuesta a lesiones en el ADN. La proteína p53 a continuación activa la transcripción del gen que codifica el inhibidor de Cdk p21, dando lugar a la inhibición de los complejos Cdk2/ciclina E o ciclina A y a la detención del ciclo celular.

duce la parada del ciclo celular en G_1 y S, y Cdk1, que provoca la detención del ciclo en G_2.

En las células de mamífero, la detención en el punto de control de daño de ADN, también está mediada por la acción de una proteína adicional conocida como **p53**, que es fosforilada tanto por ATM como por Chk2 (**Fig. 17.20**). La fosforilación estabiliza a p53, que de otro modo es rápidamente degradada, resultando en un incremento rápido de los niveles de p53 en respuesta al ADN lesionado. La proteína p53 es un factor de transcripción, y el aumento de las concentraciones de p53 da lugar a la inducción de Cdk de la familia Cip/Kip, p21 que inhibe los complejos Cdk2 con ciclina E (véase Tabla 17.1).

Curiosamente, el gen que codifica la proteína p53 se encuentra mutado con frecuencia en los cánceres humanos. La pérdida de la función de p53 como resultado de estas mutaciones previene la detención del ciclo celular en respuesta a lesiones del ADN, de modo que el ADN lesionado es replicado y transmitido a células hijas en lugar de ser reparado. Esta herencia de ADN dañado resulta en una frecuencia incrementada de mutaciones y a la inestabilidad general del genoma celular, lo que contribuye al desarrollo del cáncer. Las mutaciones en el gen *p53* se encuentran entre las alteraciones genéticas más comunes en los cánceres humanos (véase Cap. 19), ilustrando la importancia crítica de la regulación del ciclo celular en la vida de los organismos multicelulares.

Acontecimientos de la fase M

La fase M es el período más llamativo del ciclo celular, en el que se produce la reorganización de casi todos los componentes de la célula. Durante la mitosis (división nuclear) los cromosomas se condensan, la envuelta nuclear de la mayoría de las células se desintegra, el citoesqueleto se reorganiza para formar el huso mitótico, y los cromosomas migran a polos opuestos. Tras la segregación de los cromosomas se suele producir la división de la célula (citocinesis). Aunque muchos de estos acontecimientos ya han sido descritos en capítulos anteriores, se revisan aquí en el contexto de una visión coordinada de la fase M y la acción de MPF (Cdk1/ciclina B).

Etapas de la mitosis

Aunque muchos de los detalles de la mitosis varían entre los diferentes organismos, los procesos básicos que aseguran la segregación fidedigna de las cromátidas hermanas se conservan en todos los eucariotas. Entre estos procesos básicos de la mitosis se incluyen la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, y la unión de los cromosomas a los microtúbulos del huso. Una vez llegado a este punto, las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso, tras lo que se forman los núcleos hijos.

Tradicionalmente, la mitosis se divide en cuatro primeras etapas —**profase**, **metafase**, **anafase**, y **telofase**— que, en el caso de la célula animal, se ilustran en las **Figuras 17.21** y **17.22**. El comienzo de la profase queda determinado por la aparición de los cromosomas condensados, cada uno de los

ANIMACIÓN 17.5

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.5

Mitosis en una célula animal. La mitosis, que es la división del núcleo, consiste en cuatro fases —profase, metafase, anafase y telofase— y está seguida de la división del citoplasma, denominada citocinesis.

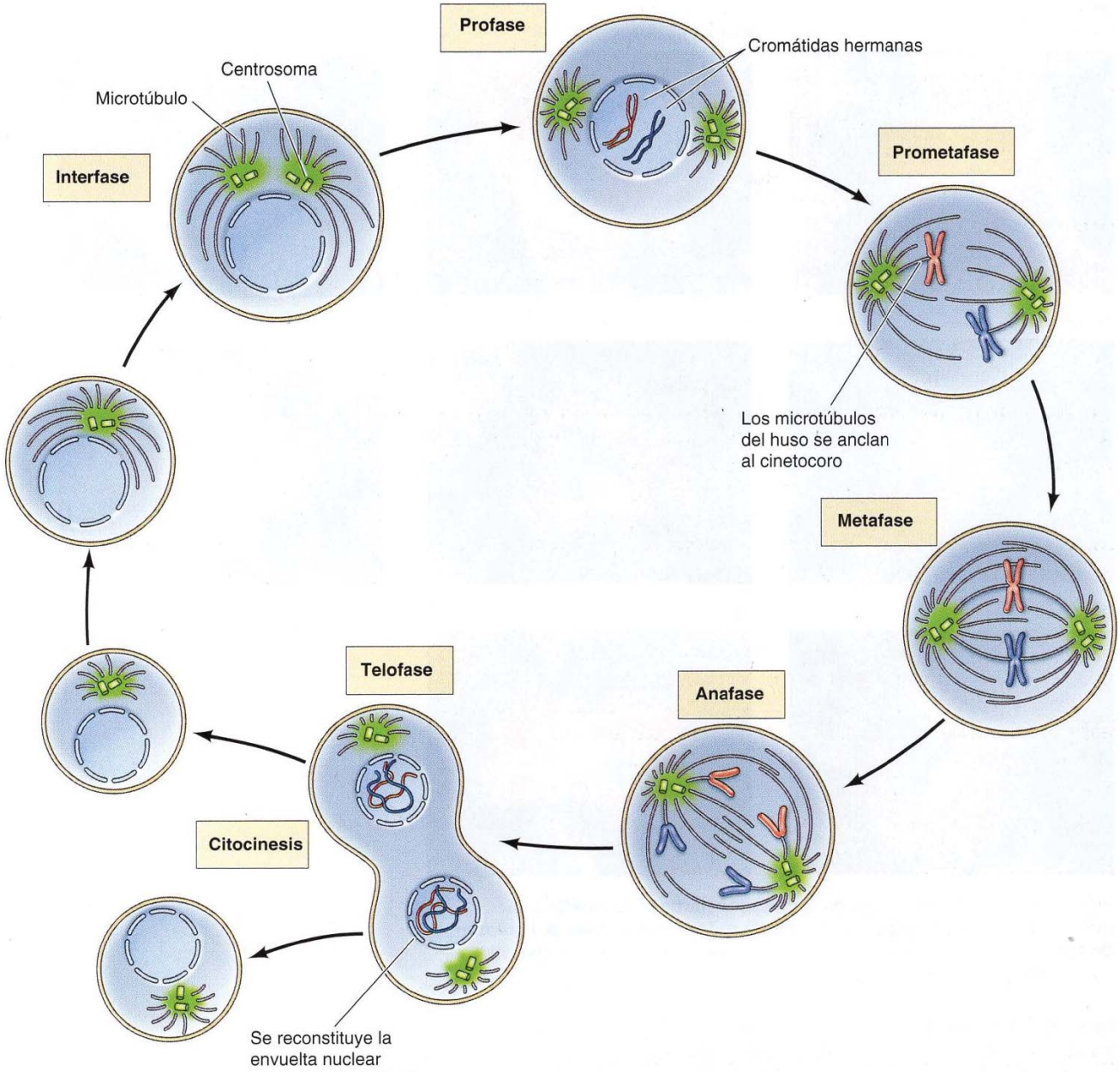


FIGURA 17.21 Etapas de la mitosis en la célula animal. Durante la profase, los cromosomas se condensan y los centrosomas se desplazan a lados opuestos del núcleo, comenzando la formación del huso mitótico. La ruptura de la envuelta nuclear permite a los microtúbulos del huso anclarse a los cinetocoros de los cromosomas. Durante la prometafase los cromosomas se agitan hacia delante y hacia atrás entre los centrosomas y el centro de la célula, para finalmente quedar alineados en la zona media del huso (metafase). En la anafase, las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso. La mitosis termina con la reconstitución de las envolturas nucleares y con la descondensación de los cromosomas en la telofase, y la citocinesis da lugar a dos células hijas interfásicas. Conviene destacar que cada célula hija recibe un centrosoma que se duplicará previamente a la siguiente mitosis.

VÍDEO 17.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v17.3

Mitosis. La mitosis es la fase más espectacular del ciclo celular, correspondiente a la separación de los cromosomas hijos, y suele terminar con la división de la célula.

cuales está constituido por dos cromátidas hermanas (las moléculas de ADN hijas que se produjeron en la fase S). Estas moléculas de ADN replicado permanecen entrelazadas durante la fase S y G_2, desenmarañándose durante el proceso de la condensación de la cromatina. Las cromátidas herma-

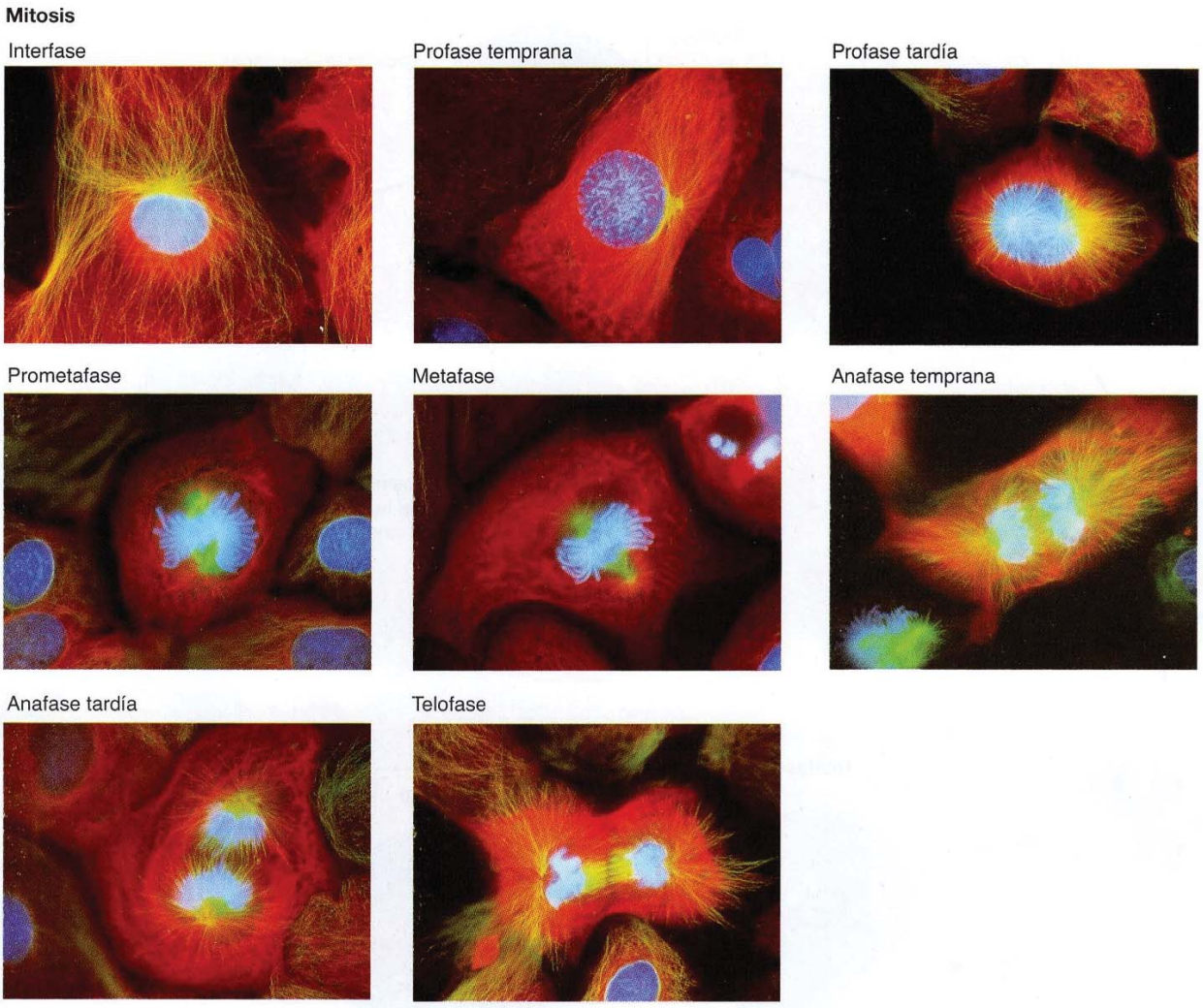


FIGURA 17.22 Micrografías de fluorescencia de la cromatina, la queratina y los microtúbulos durante la mitosis de células del pulmón de tritón. La cromatina se tiñe de azul, la queratina se tiñe de rojo, y los microtúbulos se tiñen de verde.

nas condensadas se mantienen unidas a través del **centrómero**, que (como ya se trató en el Cap. 6) es una región cromosómica a la que se unen proteínas dando lugar al **cinetocoro** —el lugar de anclaje de los microtúbulos del huso—. Además de la condensación de los cromosomas, durante la profase se producen cambios en el citoplasma que conducen al desarrollo del huso mitótico. Los **centrosomas** (que se duplicaron en la interfase) se separan y migran a lados opuestos del núcleo. Ahí actúan como los dos polos del **huso mitótico**, que comienza a formarse durante la profase tardía.

En los eucariotas superiores el final de la profase se corresponde con la rotura de la envuelta nuclear. Sin embargo, este desensamblaje del núcleo no es una característica universal de la mitosis y no ocurre en todas las células. Algunos eucariotas unicelulares (por ejemplo, levaduras) sufren la denominada mitosis cerrada, en la que la envuelta nuclear permanece intacta (**Fig. 17.23**). En la mitosis cerrada los cromosomas descendientes migran a polos opuestos del núcleo, que a continuación se divide en dos. En estas células, los cuerpos polares del huso están incluidos en la envuelta nuclear, y el núcleo se divide en dos tras la migración de los cromosomas hijos a los polos opuestos del huso.

VÍDEO 17.4

sites.sinauer.com/cooper7e/v17.4

Mitosis con proteínas fluorescentes. Durante la mitosis, los cromosomas se condensan, la envuelta nuclear se rompe, el citoesqueleto forma el huso mitótico y los cromosomas se mueven a polos opuestos.

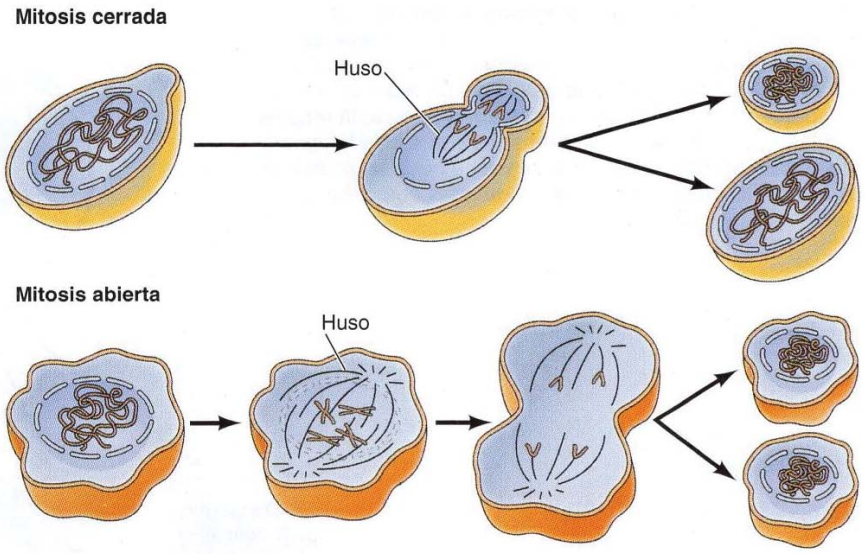


FIGURA 17.23 Mitosis abierta y cerrada. Durante la mitosis cerrada, la envuelta nuclear permanece intacta y los cromosomas migran a polos opuestos de un huso en el interior del núcleo donde se dividen en dos. Durante la mitosis abierta, la envuelta nuclear se degrada y después se reforma en torno a dos juegos de cromosomas separados.

Una vez terminada la profase, la célula entra en **prometafase** —un período de transición entre la profase y la metafase—. Durante la prometafase los microtúbulos del huso mitótico se anclan a los cinetocoros de los cromosomas condensados. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se disponen a los dos lados opuestos del cromosoma, por lo que se unen a los microtúbulos que surgen de los polos opuestos del huso. Los cromosomas se mueven hacia delante y hacia atrás hasta que se alinean en la placa metafásica en la mitad del huso. Llegado a este punto la célula ha alcanzado la metafase (véase Fig. 17.21).

La mayoría de las células permanecen en metafase poco tiempo antes de continuar a la anafase. La transición de metafase a anafase se produce por la rotura de la unión entre las cromátidas hermanas, las cuales se separan y migran a polos opuestos del huso. La mitosis finaliza con la telofase, durante la cual los núcleos se regeneran y los cromosomas se descondensan. La citocinesis normalmente comienza durante la anafase tardía y se completa al final de la telofase, dando lugar a dos células hijas en interfase.

Paso a la mitosis

La mitosis supone unos cambios muy importantes en varios componentes celulares, que llevan a la reorganización casi total de la estructura celular. Como ya se trató anteriormente en este capítulo, estos procesos son provocados mediante la activación de la proteína quinasa Cdk1/ciclina B (MPF). Cdk1/ciclina B actúan como reguladores principales de la transición a la fase M tanto a través de la activación de otras proteína quinasas mitóticas como por fosforilación directa de algunas de las proteínas estructurales que participan en esta reorganización celular (**Fig. 17.24**). En particular, las proteína quinasas de las familias **cinasas Aurora (Aurora A y Aurora B)** y **cinasas tipo Polo** se activan coordinadamente con Cdk1 para señalizar el paso a la fase M. Las cinasas Aurora y tipo Polo actúan con Cdk1 en un bucle de retroalimentación positiva: Cdk1 activa las cinasas Aurora, que activan las ci-

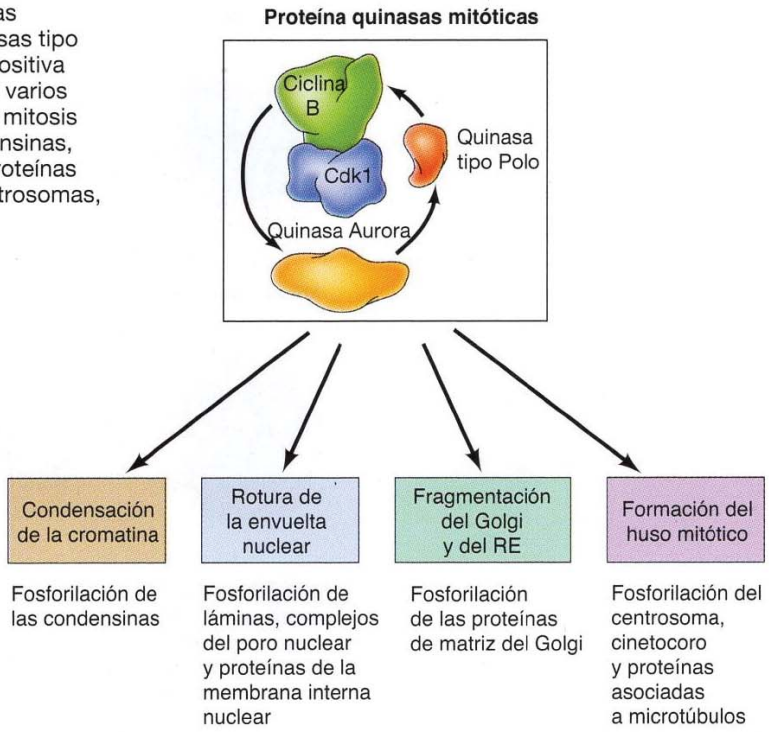


FIGURA 17.24 Proteínas quinasas mitóticas. Las proteínas quinasas mitóticas Cdk1, Aurora y quinasas tipo Polo se activan en un bucle de retroalimentación positiva durante la puesta en marcha de la fase M. Inducen varios cambios en el núcleo y en el citoplasma durante la mitosis mediante la fosforilación de proteínas como condensinas, cohesinas, componentes de la envuelta nuclear, proteínas de matriz del Golgi, y proteínas asociadas con centrosomas, cinetocoros y microtúbulos.

nasas tipo Polo, que a su vez activan la Cdk1. Todas esas proteína quinasas tienen múltiples funciones en la mitosis.

La condensación de la cromatina interfásica para dar lugar a los cromosomas compactos de las células mitóticas es un suceso clave en la mitosis, ya que permite que los cromosomas se desplacen por el huso mitótico sin romperse y sin enredarse. Como ya se trató en el Capítulo 6, la cromatina en los núcleos interfásicos se condensa aproximadamente por un factor de mil para formar los cromosomas metafásicos. Esta cromatina tan condensada no puede transcribirse, por lo que la transcripción cesa al producirse la condensación de la cromatina. A pesar de la gran importancia de este hecho, todavía no se comprende por completo ni la estructura de los cromosomas metafásicos ni los mecanismos moleculares de la condensación de la cromatina. Sin embargo, recientemente se han descrito unos complejos proteicos denominados **condensinas**, que son miembros de una clase de proteínas de «mantenimiento estructural de la cromatina» (SMC: *structural maintenance of chromatin*) que juegan papeles clave en la organización de los cromosomas eucariotas.

Las condensinas y otra familia de proteínas SMC, denominadas **cohesinas**, contribuyen a la segregación cromosómica durante la mitosis **(Fig. 17.25)**. Las cohesinas se unen al ADN en fase S y mantienen la unión entre las cromátidas hermanas después de la replicación del ADN.

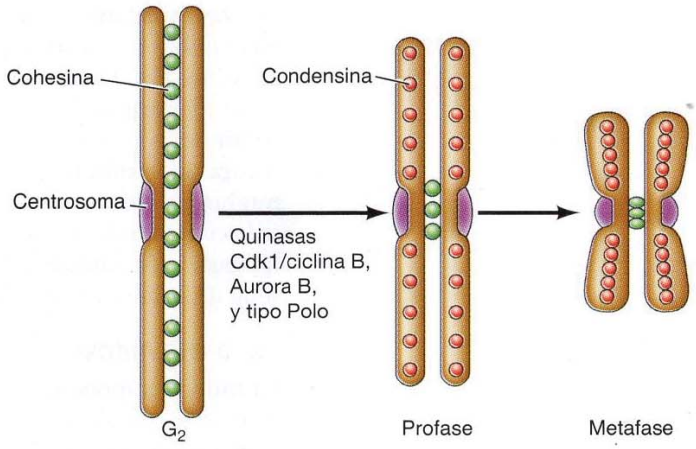


FIGURA 17.25 Acción de las cohesinas y condensinas. Las cohesinas se unen al ADN durante la fase S y mantienen dicha unión entre cromátidas hermanas después de la replicación del ADN en S y en G_2. Cuando la célula pasa a la fase M, las condensinas son fosforiladas por la cinasa Aurora B y Cdk1; las cohesinas, por las cinasas Aurora B y tipo Polo. Las cohesinas son sustituidas por condensinas a lo largo de la mayor parte del cromosoma, conservándose solo en el centrómero, y las condensinas provocan la condensación de la cromatina.

Cuando la célula pasa a la fase M, las condensinas son activadas mediante su fosforilación por parte de Cdk1 y cinasa Aurora B. A continuación, las condensinas sustituyen a las cohesinas (fosforiladas por las cinasas Aurora B y tipo Polo) a lo largo de la mayor parte del cromosoma, de modo que las cromátidas hermanas solo están unidas en el centrómero. Las condensinas también inducen la condensación cromatínica, desencadenando la formación de cromosomas metafásicos. La fosforilación de la histona H3 serina-10 por la quinasa Aurora B desempeña también un papel importante en la condensación de cromosomas mitóticos.

La degradación de la envuelta nuclear, que es uno de los eventos más dramáticos de la mitosis, implica modificaciones en todos sus componentes: las membranas nucleares se fragmentan, los complejos de poro nuclear se disocian, y la lámina nuclear se despolimeriza. La despolimerización de la lámina nuclear (la red de filamentos que subyacen a la membrana nuclear) resulta de la fosforilación de las lamininas por Cdk1/ciclina B (**Fig. 17.26**). La fosforilación causa la rotura de los filamentos de laminina en dímenos individuales de laminina, desencadenando directamente la despolimerización de la lámina nuclear. Cdk1 también fosforila a diversas proteínas en la membrana nuclear interna y en el complejo del poro nuclear, desencadenando el desensamblaje de los complejos de poro nuclear y la se-

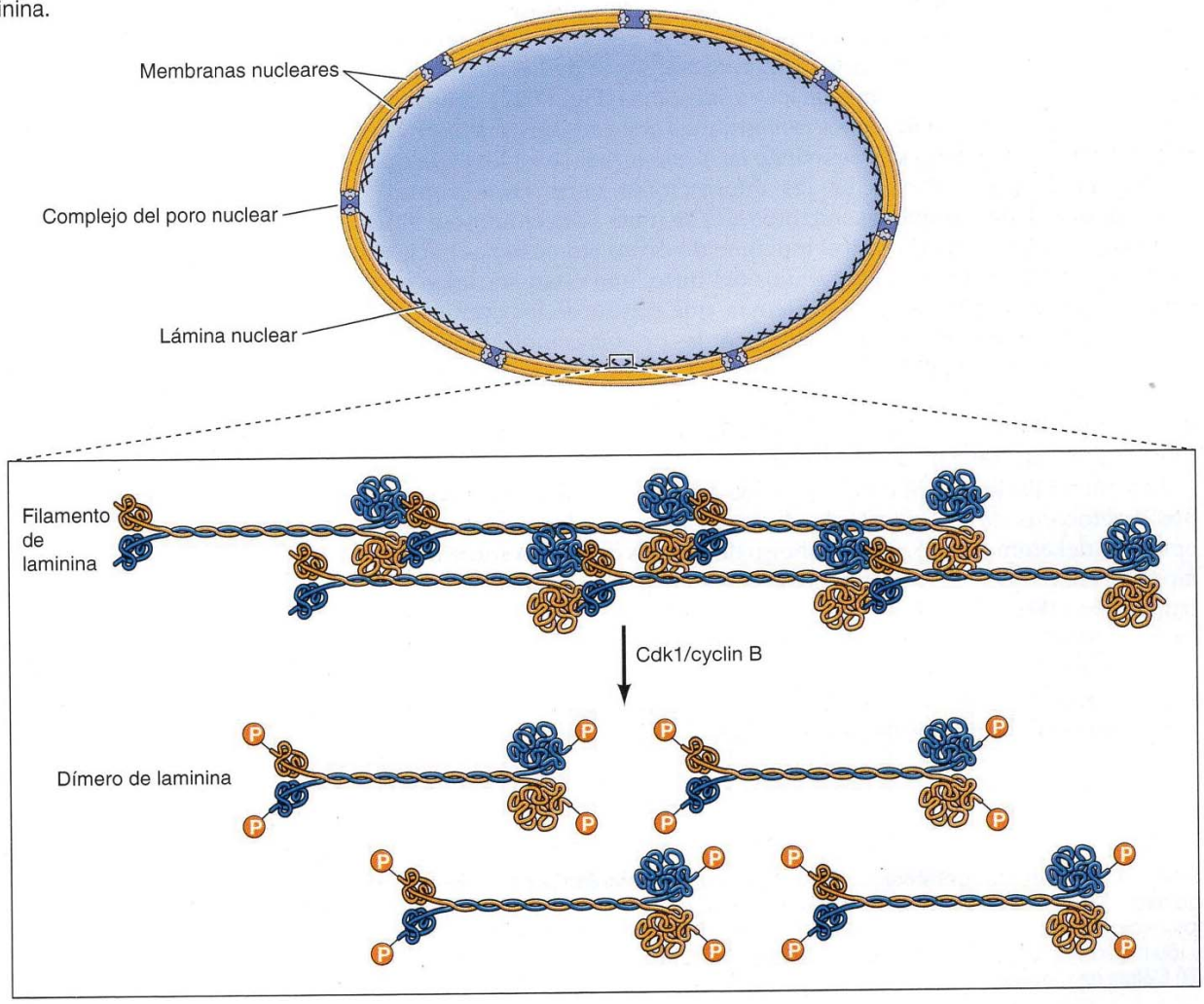


FIGURA 17.26 Degradación de la envuelta nuclear. Cdk1/ciclina B fosforila las lamininas nucleares además de proteínas del complejo del poro nuclear y de la membrana nuclear interna. La fosforilación de las lamininas causa que los filamentos que forman la lámina nuclear se disocien en dímeros libres de laminina.

paración de la membrana nuclear interna de las lamininas y la cromatina. En las células animales, las proteínas integrales de la membrana nuclear son absorbidas a continuación en el retículo endoplásmico, que permanece como una red intacta y se distribuye a las células hijas durante la mitosis.

El aparato de Golgi se fragmenta en pequeñas vesículas en la mitosis, que pueden ser absorbidas por el retículo endoplásmico o distribuidas directamente a las células hijas durante la citocinesis. La descomposición del aparato de Golgi en vesículas está mediada por la fosforilación de múltiples proteínas de la matriz del Golgi que llevan a cabo Cdk1 y las cinasas tipo Polo.

La reorganización del citoesqueleto que culmina en la formación del huso mitótico resulta de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (véase Cap. 13). Al inicio de la profase, los centrosomas, duplicados en la fase S, se separan y desplazan hacia extremos opuestos del núcleo. Antes de separarse, pasan por un proceso de maduracion en el que se alargan y reclutan γ-tubulina y otras proteínas necesarias para la formación del huso. La maduración del centrosoma, la separación y el ensamblaje del huso están producidos por las **cinasas Aurora A** y **tipo Polo**, situadas en los centrosomas. La tasa de renovación de microtúbulos se incrementa de 5 a 10 veces durante la mitosis, resultando en la despolimerización y el encogimiento de los microtúbulos durante la interfase. Se cree que este mayor recambio se debe a la fosforilación de las proteínas asociadas a los microtúbulos por parte de las proteína quinasas mitóticas, como Cdk1, cinasas Aurora A y tipo Polo. El número de microtúbulos que emana de los centrosomas también aumenta, de forma que los microtúbulos durante la interfase son sustituidos por grandes cantidades de microtúbulos cortos que radian desde los centrosomas.

La rotura de la envuelta nuclear permite a algunos de los microtúbulos del huso unirse a los cinetocoros de los cromosomas (**Fig. 17.27**), comenzando entonces el movimiento de los cromosomas que caracteriza a la prometafase. Entre las proteínas que se reúnen en el cinetocoro se incluyen la cinasa Aurora B, que participa en las interacciones entre cromosomas y microtúbulos. Una vez que los microtúbulos se unen a los cromosomas, los motores microtubulares dirigen el movimiento de los cromosomas hacia los extremos «menos» de los microtúbulos del huso, que están anclados en el centrosoma. La acción de estas proteínas, que conducen los cromosomas hacia el centrosoma, está contrarrestada por las proteínas motoras dirigidas al extremo «más» y por el crecimiento de los microtúbulos del huso, que fuerzan a los cromosomas a alejarse de los polos del huso. Por tanto, los cromosomas en la prometafase se agitan hacia delante y hacia atrás entre los centrosomas y la zona media del huso.

Los microtúbulos de los polos opuestos del huso se acaban uniendo a los dos cinetocoros de las cromátidas hermanas (que se localizan en lados opuestos del cromosoma), y el equilibrio de fuerzas que actúa sobre los cromosomas hace que éstos queden alineados en la placa metafásica en la mitad del huso (**Fig. 17.28**). Como se analizó en el Capítulo 13, el huso consiste en microtúbulos cinetocóricos y cromosómicos, que se encuentran unidos a los cromosomas, además de microtúbulos interpolares, que se solapan entre sí en el centro de la célula. Adicionalmente, los microtúbulos astrales cortos radian hacia el exterior desde los centrosomas hacia la periferia celular.

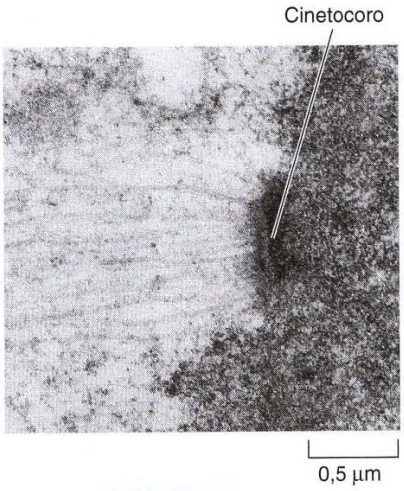
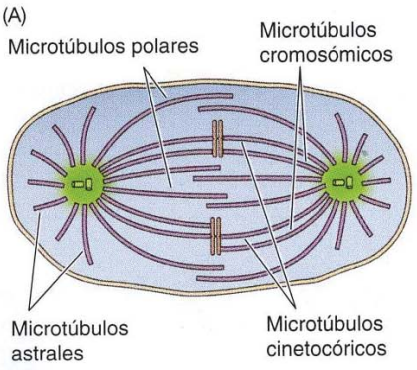


FIGURA 17.27 Micrografía electrónica de microtúbulos unidos al cinetocoro de un cromosoma.



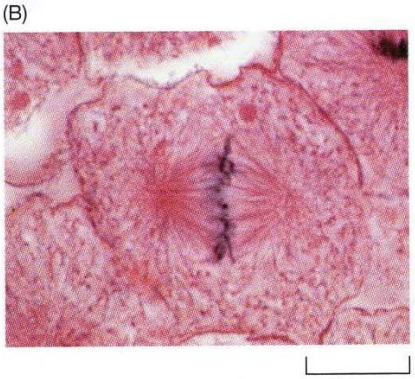


FIGURA 17.28 Huso metafásico. (A) El huso está constituido por tres tipos de microtúbulos. Los microtúbulos cinetocóricos se anclan a los cromosomas, los microtúbulos interpolares se superponen entre sí en el centro de la célula, y los microtúbulos astrales irradian desde el centrosoma hacia la periferia celular. (B) Célula en metafase del pez corégono.

VÍDEO 17.5

sites.sinauer.com/cooper7e/v17.5

Punto de control de ensamblaje del huso. El punto de control de ensamblaje del huso vigila la alineación de los cromosomas en el huso de la metafase.

◆ Las anomalías en la segregación cromosómica resultantes de fallos del punto de control de ensamblaje del huso son comunes en las células cancerosas y se cree que juegan un papel importante en el desarrollo de múltiples tumores (véase Cap. 19).

Punto de control de ensamblaje del huso y progresión hacia anafase

Como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, el **punto de control de ensamblaje** del huso monitoriza el alineamiento de los cromosomas en el huso metafásico. Una vez que esto se ha producido, la célula inicia la anafase y completa la mitosis. El paso de la metafase a la anafase se debe a la proteólisis de proteínas reguladoras mediada por las ubiquitinas, la cual se dispara por la activación del APC/C ubiquitina ligasa. El APC/C es inhibido por los complejos Cdk2/ciclina E y A durante las fases S y G_2 del ciclo celular. Sin embargo, al comienzo de la mitosis, la activación del APC/C es inducida como consecuencia de la fosforilación por Cdk1/ciclina B. El APC/C sin embargo, permanece inactivo hasta que la célula rebasa el punto de control de la metafase, después del cual la activación del sistema de degradación constituido por las ubiquitinas permite el paso de la metafase a la anafase y la progresión a través del resto de la mitosis.

El punto de control de ensamblaje del huso es notable, en que la presencia de un solo cromosoma no alineado es suficiente para impedir la activación del APC/C. El punto de control está mediado por un complejo de proteínas (**complejo del punto de control mitótico** o **MCC**), formado en cinetocoros libres y que inhibe el APC/C (**Fig. 17.29**). El complejo del punto de control mitótico está formado por cuatro proteínas: BubR1, Bub3,

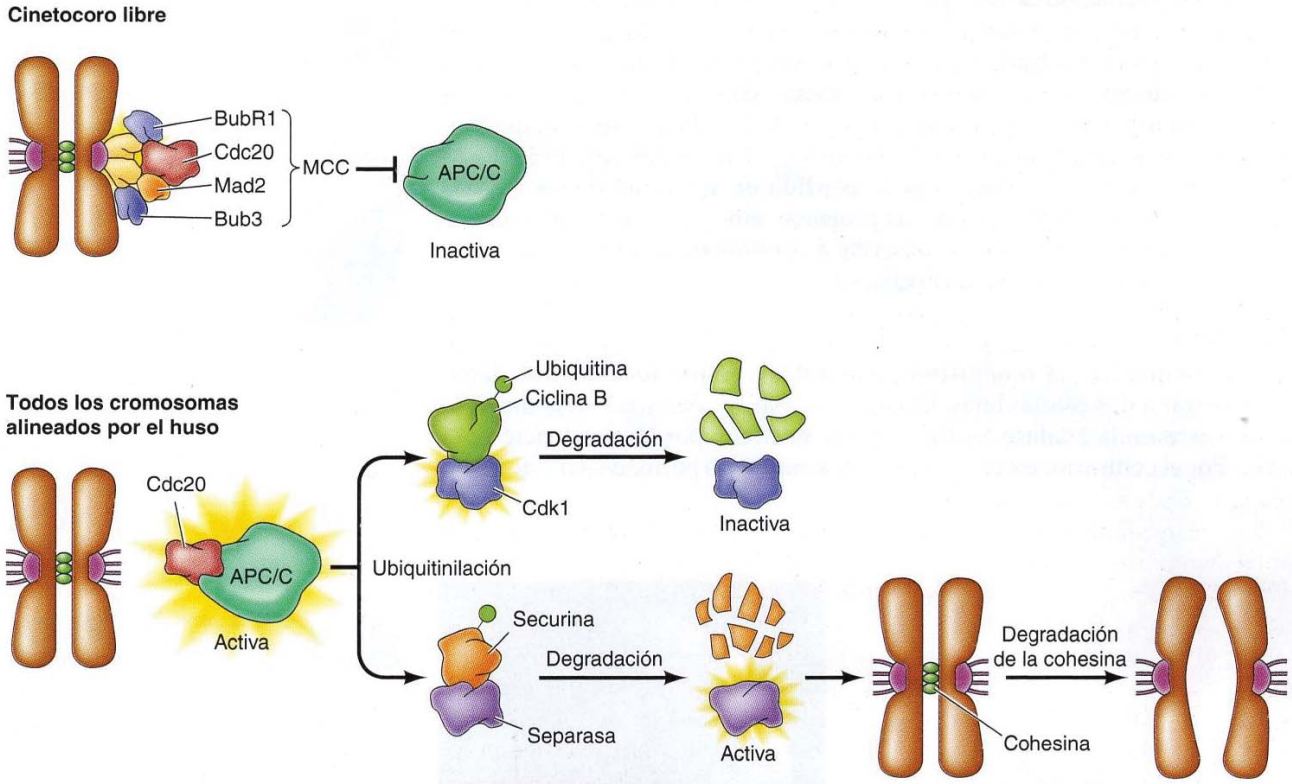


FIGURA 17.29 Punto de control del ensamblaje del huso. La progresión hacia la anafase está mediada por la activación de la APC/C ubiquitina ligasa. Los cinetocoros libres dan lugar al ensamblaje de un complejo de proteínas (el complejo del punto de control mitótico, MCC) que inhiben al APC/C. Una vez que todos los cromosomas se encuentran alineados sobre el huso, el complejo inhibidor ya no se forma y se activa el APC/C. APC/C ubiquitiliza a la ciclina B, dando lugar a su degradación y a la inactivación de Cdk1. Adicionalmente, APC/C ubiquitiliza a la securina, dando lugar a la activación de la separasa. La separasa degrada una subunidad de la cohesina, rompiendo el enlace entre cromátidas hermanas e iniciando la anafase.

Mad2 y Cdc20. La proteína Cdc20 es el activador necesario de APC/C, aunque su actividad se bloquea cuando se une a las proteínas Mad y Bub en el MCC. Cuando los microtúbulos se han unido a los cinetocoros, los complejos MCC ya no se forman y Cdc20 es capaz de activar APC/C, en lugar de inhibirlo.

La activación del APC/C resulta en la ubiquitilación y degradación de dos proteínas diana que desencadenan el paso de metafase a anafase. El inicio de la anafase se debe a la degradación de la ciclina B, que da lugar a la inactivación de Cdk1, y a la degradación de un componente de las cohesinas, que mantiene la conexión entre cromátidas hermanas mientras que están alineadas en la placa metafásica (véase Fig. 17.25). La degradación de las cohesinas no está catalizada directamente por el APC/C, que sin embargo degrada a una proteína denominada securina que es una subunidad inhibidora de una proteasa denominada separasa. La degradación de la securina resulta en la activación de la separasa, que a su vez degrada la cohesina. La escisión de la cohesina rompe la unión entre cromátidas hermanas, permitiendo su segregación moviéndose hacia polos opuestos del huso (**Fig. 17.30**). La separación de los cromosomas durante la anafase procede a continuación, como resultado de la acción de diversos tipos de proteínas motoras asociadas con los microtúbulos del huso (véanse Figs. 13.51 y 13.52).

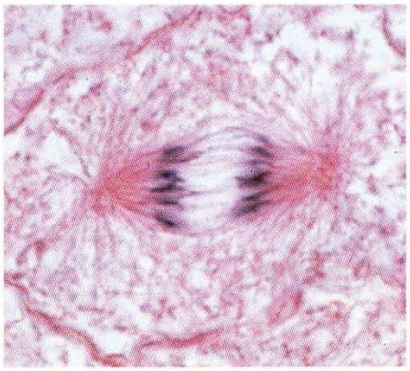


FIGURA 17.30 Célula de pez corégono en anafase.

Una vez que la célula ha llegado a la anafase, el APC/C también desencadena la degradación de las cinasas Aurora y tipo Polo, permitiendo que la célula deje la mitosis y vuelva a la interfase. Buena parte de las modificaciones celulares de estas transiciones consiste simplemente en la inversión de los acontecimientos inducidos por las cinasas Cdk1, Aurora y tipo Polo durante la mitosis. Por ejemplo, la reformación de la cubierta nuclear, descondensación de la cromatina, y el retorno de los microtúbulos al estado de interfase son el resultado directo de la pérdida de actividad de las cinasas mitóticas y la desfosforilación de las proteínas que habían sido fosforiladas al inicio de la mitosis. Como se describe a continuación, la inactivación de Cdk1 también desencadena la citocinesis.

VÍDEO 17.6

sites.sinauer.com/cooper7e/v17.6

Metafase y anafase. Durante la metafase, los cromosomas se alinean en el centro del huso, y en la anafase, las cromátidas hermanas se separan y se desplazan a polos opuestos del huso.

Citocinesis

Normalmente, tras la conclusión de la mitosis se produce la citocinesis, dando lugar a dos células hijas. La citocinesis suele comenzar en la mayoría de los casos en la anafase tardía y se desencadena por la inactivación del Cdk1. Por el contrario, las cinasas Aurora y tipo Polo permanecen activas en

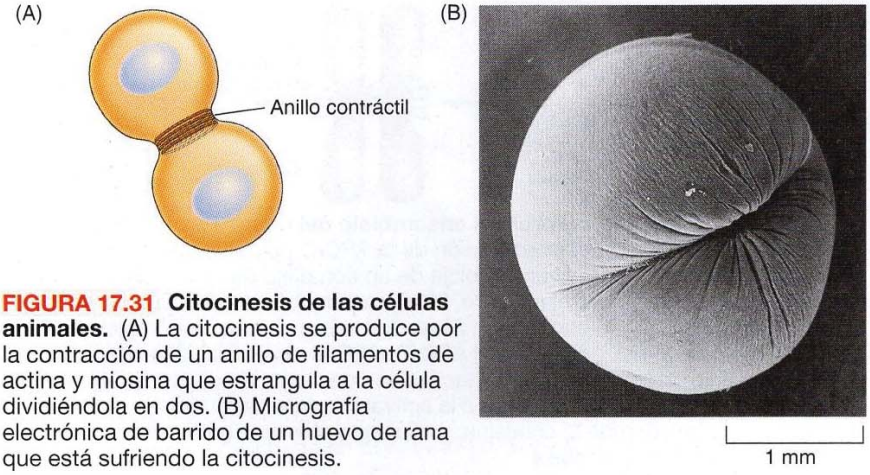


FIGURA 17.31 Citocinesis de las células animales. (A) La citocinesis se produce por la contracción de un anillo de filamentos de actina y miosina que estrangula a la célula dividiéndola en dos. (B) Micrografía electrónica de barrido de un huevo de rana que está sufriendo la citocinesis.

ANIMACIÓN 17.6

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.6

Citocinas en las plantas superiores. Durante la división celular, una célula vegetal divide su citoplasma depositando vesículas del Golgi que contienen precursores de la pared celular en el punto previo de la placa metafásica, construyendo una estructura mayor y con forma discoidal que crece hacia el exterior y se fusiona con la membrana plasmática.

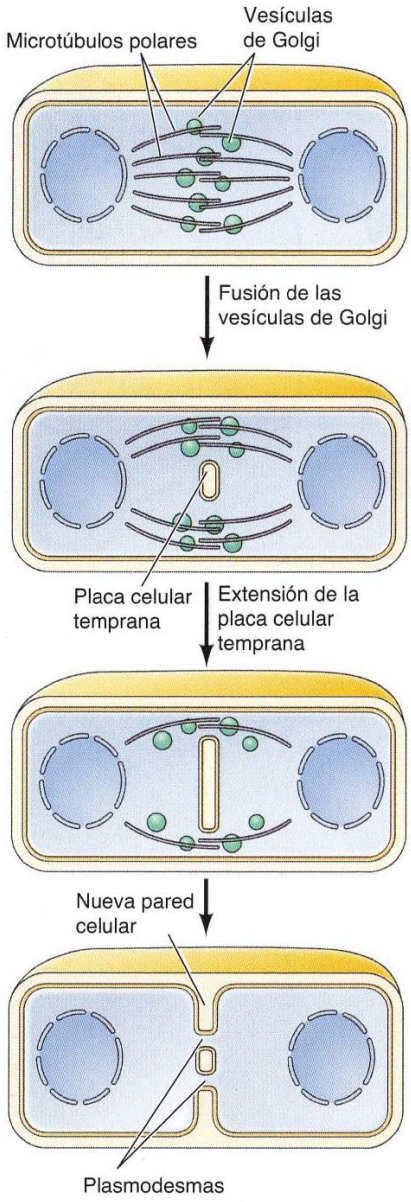


FIGURA 17.32 Citocinesis en las plantas superiores. Las vesículas del Golgi que contienen precursores de la pared celular se unen a los microtúbulos interpolares, en el lugar donde se encontraba la placa metafásica. La fusión de estas vesículas da lugar a una estructura discoide, rodeada de membrana (la placa celular temprana) que crece hacia afuera y que se funde con la membrana plasmática parental. Las células hijas permanecen conectadas en los plasmodesmas.

la anafase, y son muy importantes para coordinar la división nuclear y citoplásmica de la célula.

Como ya se vio en el Capítulo 13, la citocinesis de las células animales se produce mediante un **anillo contráctil** de filamentos de actina y miosina II que se forma debajo de la membrana plasmática (**Fig. 17.31**). La formación de este anillo está activada por las cinasas Aurora y tipo Polo en una localización determinada por la posición del huso mitótico, de modo que la célula finalmente se divide por un plano que atraviesa la placa de metafase perpendicular al huso. A medida que los filamentos de actina y miosina se contraen, estos tiran de la membrana plasmática, lo que hace que la célula se estrangule y quede dividida en dos. A continuación, se rompe el puente entre las dos células hijas, y la membrana plasmática se vuelve a sellar.

El mecanismo de la citocinesis es diferente en las células de las plantas superiores. En vez de ser estranguladas y divididas en dos por el anillo contráctil, estas células se dividen mediante la formación de nuevas paredes celulares y de nuevas membranas plasmáticas dentro de la célula (**Fig. 17.32**). En la telofase temprana, vesículas del aparato de Golgi que portan precursores de la pared celular se unen a los microtúbulos del huso y se acumulan en el lugar de la placa metafásica. Entonces estas vesículas se fusionan formando una estructura grande, en estructura discoide y envuelta por membrana, y su contenido en polisacáridos se ensamblan para formar la matriz de una nueva pared celular (denominada **placa celular**). La placa celular se extiende hacia fuera, perpendicular al huso, hasta que alcanza la membrana plasmática. La membrana que rodea la placa celular a continuación se fusiona con la membrana plasmática parental, dividiendo a la célula en dos. Las conexiones entre células hijas (plasmodesmas, véase Fig. 15.31) se forman como resultado de una fusión incompleta de las vesículas durante la citocinesis.

Meiosis y fecundación

Los ciclos de las células somáticas tratados hasta el momento en este capítulo daban lugar a dos células hijas diploides con una dotación genética idéntica. Por el contrario, la meiosis es un tipo de ciclo celular especializado que reduce el número de cromosomas a la mitad, dando lugar a células hijas haploides. Los eucariotas unicelulares, como las levaduras, pueden sufrir meiosis así como reproducirse por mitosis. Por ejemplo, la levadura diploide de *Saccharomyces cerevisiae* sufre la meiosis y produce esporas cuando se encuentra en condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, en las plantas y en los animales pluricelulares la meiosis sólo se produce en las células germinales, donde resulta esencial para la reproducción sexual. Mientras que las células somáticas realizan la mitosis para proliferar, en las células germinales tiene lugar la meiosis para producir gametos haploides (el espermatozoide y el óvulo). El desarrollo de un nuevo organismo comienza con la fusión de estos gametos en la fecundación.

Proceso de la meiosis

A diferencia de la mitosis, la **meiosis** supone la división de una célula parental diploide en una progenie haploide, de tal manera que cada célula contiene sólo un miembro del par de cromosomas homólogos presentes en el progenitor diploide (**Fig. 17.33**). Esta reducción en el número de cromosomas se realiza mediante dos rondas consecutivas de división nuclear y celular (denominadas meiosis I y meiosis II), que ocurren tras una única ronda de replicación del ADN. Al igual que la mitosis, la meiosis I comienza después de que finalice la fase S y de que los cromosomas parentales se hayan

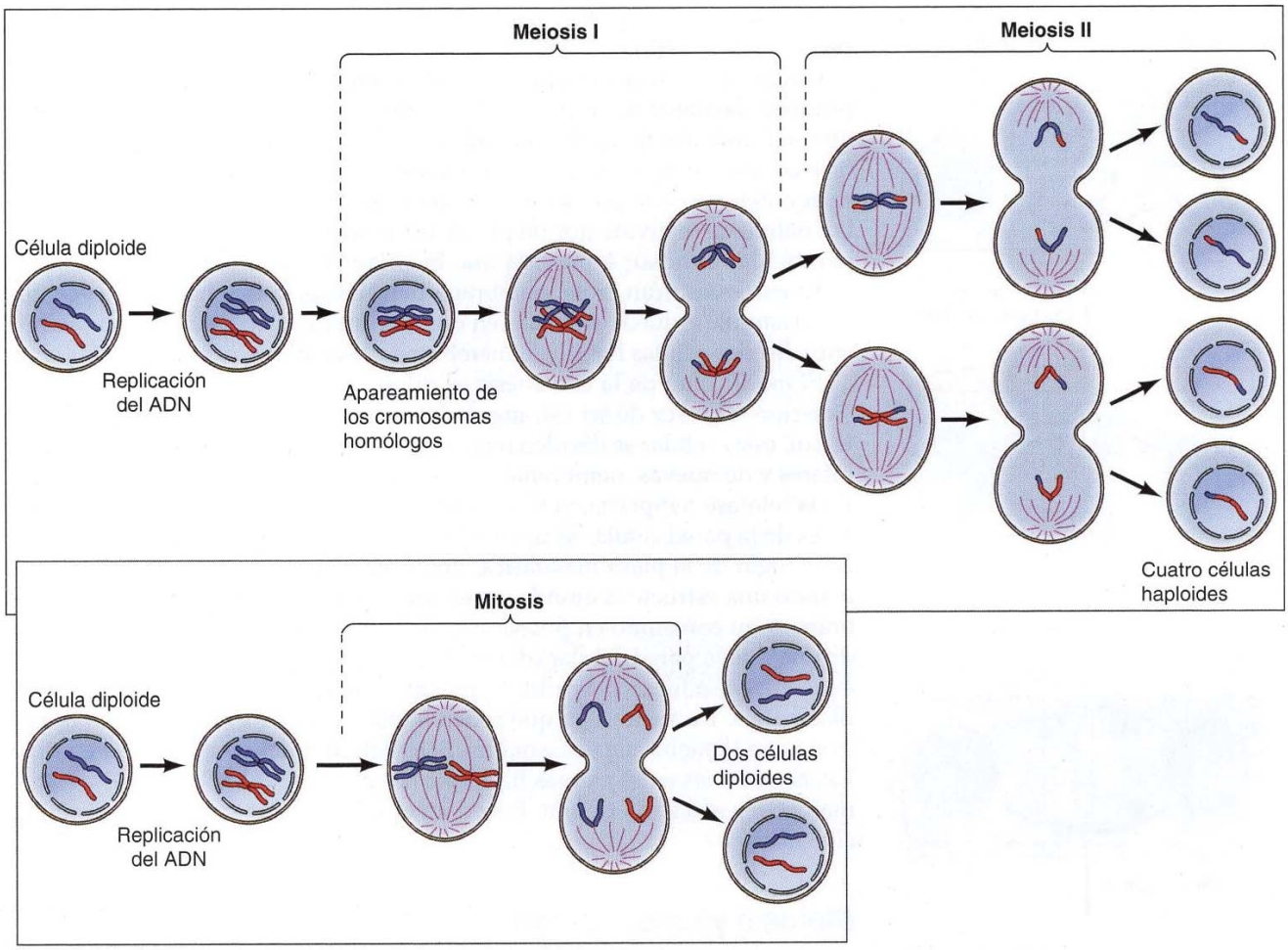


FIGURA 17.33 Comparación de la meiosis y la mitosis. Tanto la meiosis como la mitosis comienzan tras la replicación del ADN, por lo que cada cromosoma está constituido por dos cromátidas hermanas. En la meiosis I, los cromosomas homólogos se aparean y entonces segregan a células diferentes. Durante la meiosis II las cromátidas hermanas se separan, lo que se asemeja a una mitosis normal. Por tanto, la meiosis da lugar a cuatro células hijas haploides.

replicado para producir cromátidas hermanas idénticas. Sin embargo, el patrón de la segregación de los cromosomas en la meiosis I es muy diferente al de la mitosis. Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos primero se emparejan unos con otros y luego segregan a células hijas diferentes. Las cromátidas hermanas permanecen unidas, por lo que tras la meiosis I se obtienen células hijas que contienen un único miembro de cada par cromosómico (cada uno de los cuales está constituido por dos cromátidas hermanas). Tras la meiosis I se produce la meiosis II, que se asemeja a la mitosis en que las cromátidas hermanas se separan y segregan a diferentes células hijas. Por tanto, la meiosis II da como resultado cuatro células hijas haploides, cada una de las cuales contiene una copia de cada cromosoma.

El apareamiento de los cromosomas homólogos tras la replicación del ADN no sólo es un proceso clave que subyace a la segregación de los cromosomas en la meiosis, sino que también permite la recombinación entre los cromosomas de origen paterno y materno. Este emparejamiento crucial de los cromosomas homólogos tiene lugar durante una larga profase en la

ANIMACIÓN 17.7

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.7

Meiosis. Durante la meiois, una célula se divide para producir células hijas con la mitad del número de cromosomas que una célula parental.

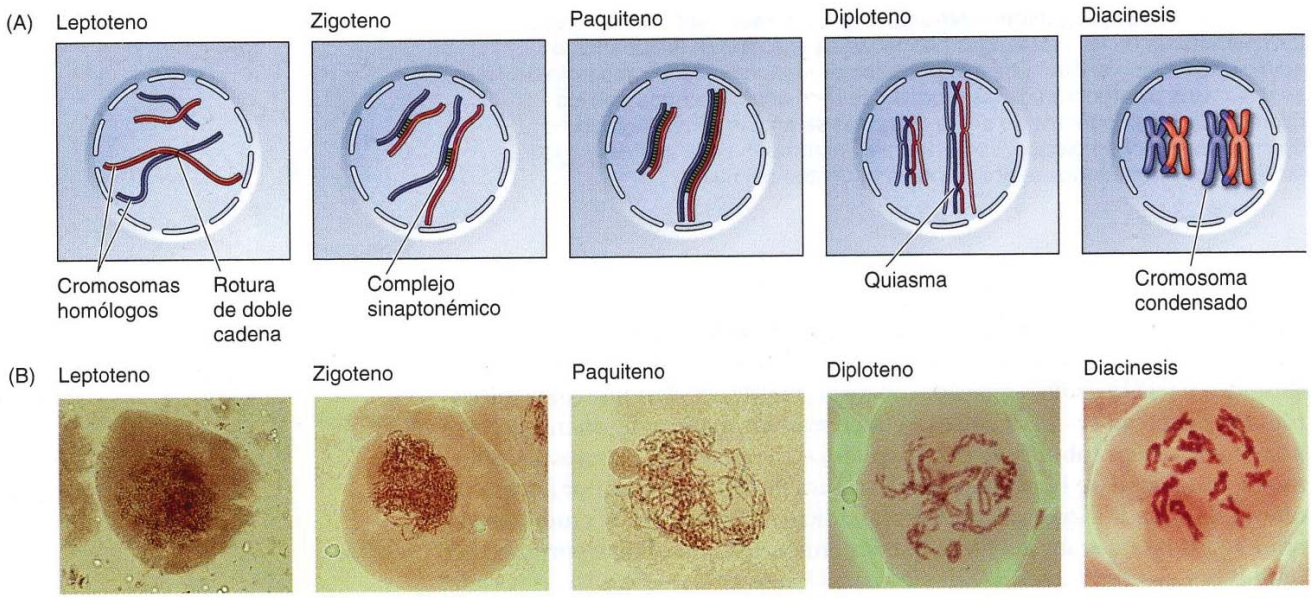
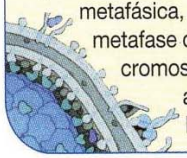


FIGURA 17.34 Etapas de la profase de la meiosis I. (A) La recombinación de cromosomas homólogos se inicia mediante la formación de roturas de doble cadena en el leptoteno. Se forman entonces una estructura en cremallera, el complejo sinaptonémico entre cromosomas homólogos durante el zigoteno y el paquiteno. Al completarse la recombinación se inicia la formación de quiasmas en los puntos de cruce y el complejo sinaptonémico desaparece en la etapa de diploteno. A continuación, los cromosomas se condensan en diacinesis en la transición a la metafase. (B) Micrografías que ilustran la morfología de los cromosomas del lirio.

ANIMACIÓN 17.8

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.8

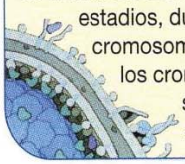
Comparación de meiosis I y mitosis. Una diferencia entre la mitosis y la meiosis puede observarse durante la metafase —durante la mitosis, los cromosomas homólogos se alinean separadamente sobre la placa metafásica, mientras que en la metafase de la meiosis I, los cromosomas homólogos se alinean por parejas en la placa metafásica.



ANIMACIÓN 17.9

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.9

Profase I de la meiosis. La profase I de la meiosis consiste en cinco estadios, durante los cuales los cromosomas se condensan y los cromosomas homólogos se emparejan entre sí y se recombinan.



meiosis I, que se divide en cinco etapas (**leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno** y **diacinesis**) en función de la morfología cromosómica (**Fig. 17.34**). La recombinación se produce con una elevada frecuencia durante la meiosis, y se inicia por roturas de doble hebra que se inducen en la profase temprana meiótica (leptoteno) por la acción de una endonucleasa altamente conservada denominada Spo11. Como se estudió en el Capítulo 7, la formación de roturas de doble hebra lleva a la formación de regiones de hebra sencilla que invaden un cromosoma homólogo mediante el apareamiento de bases complementarias (véase Fig. 7.29). La asociación estrecha de los cromosomas homólogos (**sinapsis**) comienza durante la etapa de zigoteno. Durante esta etapa una estructura proteica a modo de cremallera, denominada **complejo sinaptonémico**, se forma a lo largo de los cromosomas apareados. Este complejo mantiene a los cromosomas homólogos estrechamente unidos y alineados el uno con el otro durante la etapa de paquiteno, que se puede prolongar durante varios días. La recombinación entre los cromosomas homólogos se completa durante su asociación en la etapa de paquiteno, permaneciendo los cromosomas unidos en los lugares del sobrecruzamiento (**quiasmas**). Los complejos sinaptonémicos desaparecen en la etapa de diploteno, y los cromosomas homólogos se separan. Sin embargo, es importante destacar que permanecen unidos en los quiasmas, lo que es esencial para que se alineen correctamente en la metafase. Llegado este punto, cada par cromosómico (denominado bivalente) está constituido por cuatro cromátidas con quiasmas visibles. La diacinesis, la etapa final de la profase I, supone la transición a la metafase, durante la que los cromosomas se condensan por completo.

Durante la metafase I, los cromosomas bivalentes se alinean en el huso. A diferencia de la mitosis (véase Fig. 17.28), los cinetocoros de las cromáti-

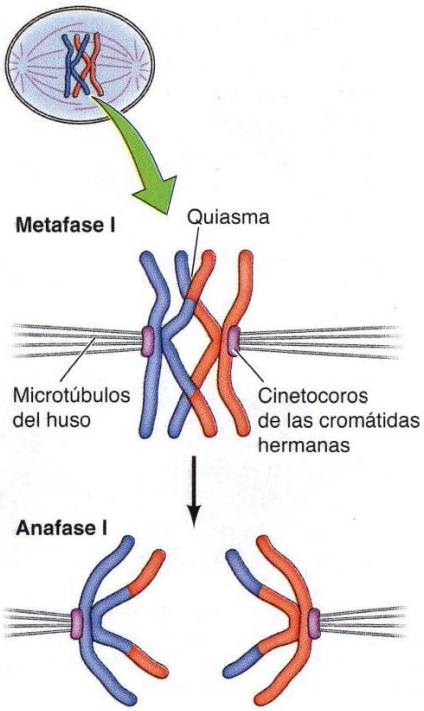


FIGURA 17.35 Segregación cromosómica en la meiosis I. En la metafase I, los cinetocoros de las cromátidas hermanas se encuentran fusionados o adyacentes el uno al otro. Los microtúbulos procedentes del mismo polo del huso se unen a los cinetocoros de las cromátidas hermanas, mientras que los microtúbulos procedentes de polos opuestos se anclan a los cinetocoros de cromosomas homólogos. Los quiasmas se rompen en la anafase I y los cromosomas homólogos migran a polos opuestos del huso.

das hermanas están adyacentes el uno al otro y se orientan en la misma dirección, mientras que los cinetocoros de los cromosomas homólogos están dirigidos hacia los polos opuestos del huso (**Fig. 17.35**). Por tanto, los microtúbulos del mismo polo del huso se unen a las cromátidas hermanas, mientras que los microtúbulos de polos opuestos se unen a los cromosomas homólogos. La anafase I comienza con la rotura de los quiasmas por los que se mantienen unidos los cromosomas homólogos. Entonces los cromosomas homólogos se separan, mientras que las cromátidas hermanas permanecen unidas por sus centrómeros. Por tanto, tras finalizar la meiosis I, cada célula hija ha recibido un miembro de cada par de homólogos, constituido por dos cromátidas hermanas.

La meiosis II comienza inmediatamente después de la citocinesis, normalmente antes de que los cromosomas se hayan descondensado por completo. A diferencia de la meiosis I, la meiosis II se asemeja a una mitosis normal. En la metafase II, los cromosomas se alinean en el huso de tal manera que los microtúbulos de los polos opuestos del huso se unen a los cinetocoros de las cromátidas hermanas. La unión entre los centrómeros de las cromátidas hermanas se rompe en la anafase II, y las cromátidas hermanas segregan a polos opuestos. A continuación se produce la citocinesis, dando lugar a células hijas haploides.

Regulación de la meiosis en los oocitos

Los oocitos (óvulos en desarrollo) de los vertebrados han sido modelos especialmente útiles para investigar el ciclo celular debido, en gran parte, a su gran tamaño y a que se manipulan fácilmente en el laboratorio. Un claro ejemplo de esto, que ya se trató anteriormente en este capítulo, lo proporciona el descubrimiento y la posterior purificación del MPF (Cdk1/ciclina B) de oocitos de rana. La meiosis de estos oocitos, al igual que la de otras especies, se regula en dos únicos puntos del ciclo celular, y los estudios sobre la meiosis de los oocitos han dado a conocer nuevos mecanismos de control del ciclo celular.

El primer punto de regulación de la meiosis de los oocitos aparece en la etapa de diploteno de la primera división meiótica (**Fig. 17.36**). Los oocitos pueden permanecer detenidos en esta etapa durante largos períodos de tiempo —hasta 40 o 50 años en el ser humano—. Mientras permanecen detenidos en diploteno, los cromosomas de los oocitos se descondensan y se transcriben activamente. Esta actividad transcripcional se refleja en el gran

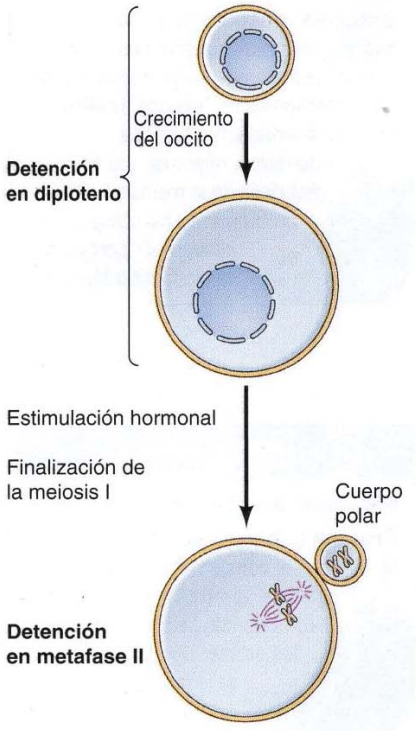


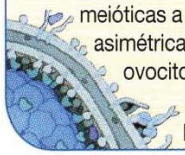
FIGURA 17.36 Meiosis de los oocitos de los vertebrados. La meiosis se detiene en la etapa de diploteno, durante la que los oocitos crecen hasta alcanzar un gran tamaño. Entonces los oocitos reanudan la meiosis en respuesta a la estimulación hormonal y completan la primera división meiótica, en la que una citocinesis asimétrica da lugar a un cuerpo polar pequeño. La mayoría de los oocitos de los vertebrados vuelve a detenerse en la metafase II.

◆ Los animales pueden clonarse mediante el procedimiento de la transferencia nuclear de células somáticas en el que el núcleo de una célula somática es transferido a un oocito en metafase II en el cual se han eliminado los cromosomas normales. A continuación, el oocito se estimula para que empiece la división y, tras su implantación en una madre adoptiva, puede dar lugar a un animal genéticamente idéntico al donante del núcleo de la célula somática. Desde la clonación de la oveja Dolly en 1997, esta tecnología se ha utilizado para crear descendencia clonada de diversas especies de mamífero (véase Cap. 18).

ANIMACIÓN 17.10

sites.sinauer.com/cooper7e/a17.10

Formación de cuerpos polares.



Durante la meiosis en las hembras de vertebrados, las divisiones meióticas a menudo son asimétricas, resultando en un solo ovocito grande y cuerpos polares mucho más pequeños.

crecimiento de los oocitos durante este período. Por ejemplo, los oocitos humanos tienen cerca de 100 µm de diámetro (más de cien veces el volumen de una célula somática típica). Los oocitos de rana son incluso mayores, con diámetros aproximadamente de 1 mm. Durante este período de crecimiento celular los oocitos acumulan gran cantidad de material de reserva, incluyendo ARN y proteínas, que se necesitan para mantener el desarrollo temprano del embrión. Como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, los ciclos celulares embrionarios tempranos tienen lugar sin que se produzca crecimiento celular, dividiéndose el óvulo fecundado rápidamente en células más pequeñas (véase Fig. 17.2).

Los oocitos de las diferentes especies varían respecto a cuándo se reanuda la meiosis y tiene lugar la fecundación. En algunos animales, los oocitos permanecen detenidos en la etapa de diploteno hasta que son fecundados, y sólo entonces prosigue la meiosis. Sin embargo, los oocitos de la mayoría de los vertebrados (incluyendo las ranas, los ratones y los humanos) reanudan la meiosis en repuesta a una estimulación hormonal y prosiguen a través de la meiosis I antes de la fecundación. La división celular tras la meiosis I es asimétrica, dando lugar a un **cuerpo polar** pequeño y a un oocito que mantiene su gran tamaño. Entonces el oocito se dispone a entrar en la meiosis II sin haber reconstituido el núcleo o sin que se hayan descondensado sus cromosomas. La mayoría de los oocitos de los vertebrados se vuelve a detener en la metafase II, donde permanecen hasta que son fertilizados o degeneran.

Al igual que la fase M de las células somáticas, la meiosis de los oocitos está controlada por la actividad de los complejos Cdk1/ciclina B. La regulación de Cdk1 durante la meiosis de los oocitos manifiesta características únicas que son responsables de la progresión meiosis I a la meiosis II y de la detención en la metafase II (**Fig. 17.37**). La estimulación hormonal de los

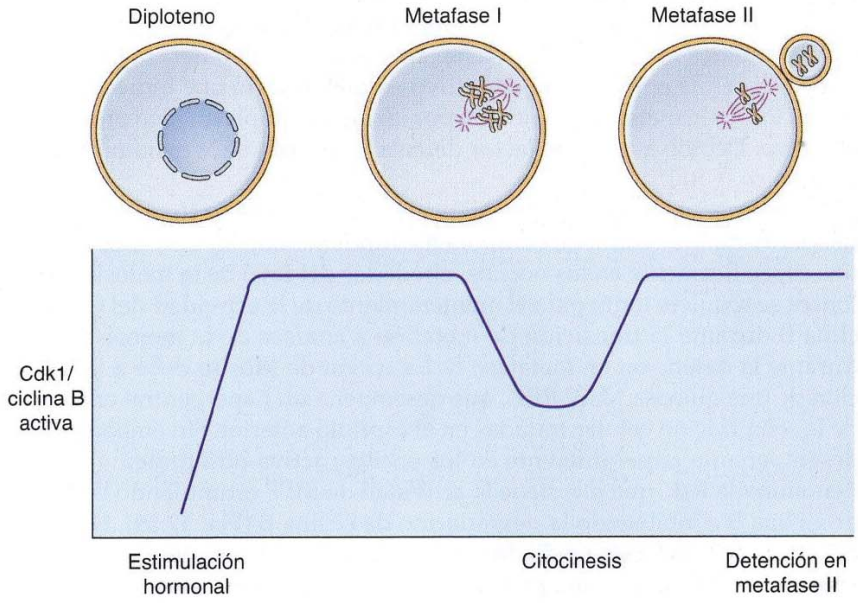


FIGURA 17.37 Actividad del Cdk1/ciclina B durante la meiosis de los oocitos. La estimulación hormonal de los oocitos en diploteno activa al Cdk1/ciclina B, lo que da lugar a que se pase a la metafase I. La actividad de Cdk1/ciclina B sólo disminuye parcialmente en la transición de metafase I a anafase I, y el oocito permanece en fase M. Una vez completada la meiosis I, la actividad de Cdk1/ciclina B aumenta de nuevo y permanece elevada durante la detención en metafase II.

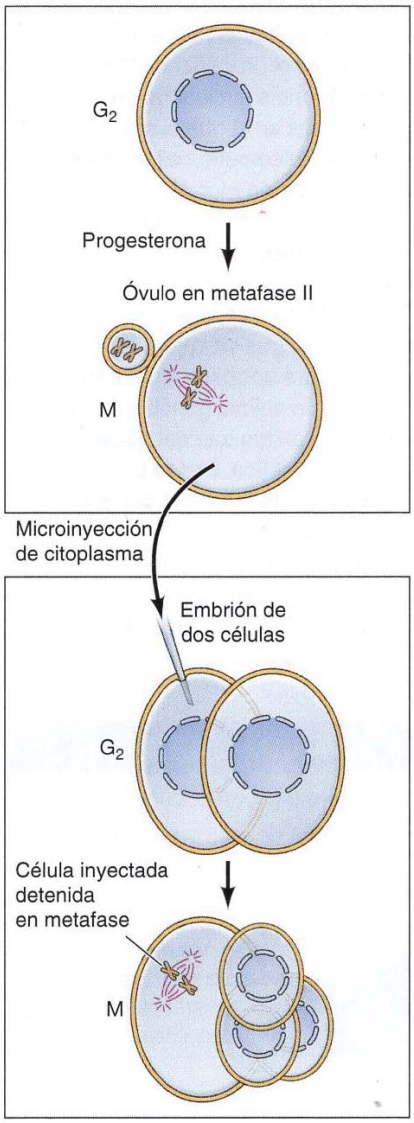


FIGURA 17.38 Identificación del factor citostático. Se microinyecta el citoplasma de un óvulo en metafase II en una célula de un embrión constituido por dos células. La célula embrionaria inyectada se detiene en metafase, mientras que la célula que no ha sido inyectada continúa su división. Por tanto, un factor en el citoplasma del óvulo en metafase II (factor citostático) ha inducido la detención en metafase de la célula embrionaria inyectada.

oocitos detenidos en diploteno hace que se reanude la meiosis al activar a Cdk1, al igual que sucede en el paso de G_2 a M en las células somáticas. Entonces, al igual que en la mitosis, Cdk1 induce la condensación de los cromosomas, la rotura de la envuelta nuclear, y la formación del huso. A partir de aquí, la activación del APC/C ubiquitina ligasa induce el paso de metafase a anafase de la meiosis I, junto con una disminución en la actividad del Cdk1. Sin embargo, en contraste con la mitosis, la actividad de Cdk1 sólo se ve parcialmente reducida, de modo que el oocito permanece en la fase M, la cromatina permanece condensada, y las envueltas nucleares no se vuelven a formar. Después de la citocinesis, aumenta de nuevo la actividad de Cdk1 y se mantiene durante el tiempo que el óvulo permanece detenido en metafase II. Por tanto, un mecanismo regulador único de los oocitos mantiene la actividad del Cdk1 durante la transición de metafase a anafase de la meiosis I y la subsiguiente detención en metafase II, lo que bloquea el paso de metafase a anafase en la meiosis II y la inactivación del Cdk1 que tendría lugar debido a la proteólisis de la ciclina B durante una fase M normal.

El factor responsable de la detención en la metafase II lo identificaron por primera vez Yoshio Mashui y Clement Markert en 1971, en el mismo conjunto de experimentos que llevaron al descubrimiento del MPF. Sin embargo, en este caso, se inyectó el citoplasma de un huevo que estaba detenido en la metafase II en una célula de embrión temprano que estaba sufriendo ciclos celulares mitóticos (**Fig. 17.38**). Tras esta inyección del citoplasma del huevo, la célula embrionaria se detuvo en metafase, lo que indicaba que la detención en la metafase se inducía por un factor citoplasmático presente en el huevo. Debido a que este factor detenía la mitosis, se le denominó **factor citostático (CSF)**.

Experimentos subsecuentes identifican a una serina/treonina quinasa denominada **Mos** como un componente fundamental del CSF. Mos se sintetiza específicamente en los oocitos, alrededor del final de la meiosis I, y entonces se requiere tanto para el mantenimiento de la actividad del Cdk1/ciclina B durante la transición de metafase a anafase de la meiosis I, como durante la detención en metafase II. La acción de Mos se debe a la activación de una quinasa MAP ERK, que desempeña un papel central en las vías de la señalización celular tratadas en el capítulo anterior. Sin embargo, ERK desempeña un papel diferente en los oocitos; activa otra proteína quinasa denominada Rsk, que mantiene la actividad de MPF estimulando la síntesis de ciclina B e inhibiendo la degradación de ciclina B (**Fig. 17.39**). La inhibición de la ciclina B está mediada por la inhibición del complejo promotor de la anafase APC/C por una proteína conocida como Emi2/Erp1, que es fosforilada por acción de Rsk e inhibe a este complejo a través de su interacción con Cdc20 —de manera semejante a la detención del ciclo en el punto de control del ensamblaje del huso por parte del complejo del punto de control mitótico (véase Fig. 17.29)—. Los oocitos pueden permanecer detenidos en este punto del ciclo celular meiótico durante varios días, esperando la fertilización.

◆ La fertilización *in vitro* (FIV) es empleada ampliamente para ayudar a las parejas infértiles. Una diversidad de trastornos reproductivos pueden ser tratados mediante este procedimiento en el que los ovocitos en metafase II son recuperados desde el ovario, fertilizados *in vitro*, y a continuación devueltos a las trompas de Falopio o al útero de la madre. El primer bebé resultante de la fertilización *in vitro* nació en 1978, y decenas de millares de parejas infértiles han sido tratadas mediante FIV desde entonces.

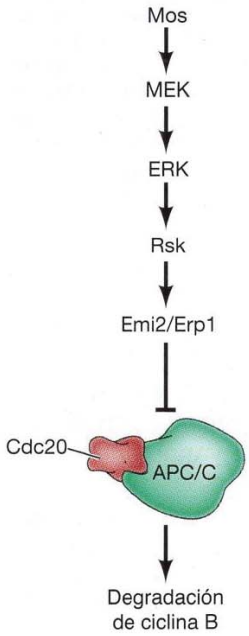


FIGURA 17.39 Mantenimiento de la actividad de Cdk1/ciclina B por la proteína quinasa Mos. La proteína quinasa Mos mantiene la actividad Cdk1/ciclina B tanto estimulando la síntesis de ciclina B como inhibiendo la degradación de ciclina B por parte del complejo promotor de la anafase ciclosoma (APC/C). Las proteína quinasas MEK, ERK y Rsk modulan la acción de Mos. Rsk fosforila la proteína Emi2/Erp1, la cual inhibe al complejo APC/C al unirse a Cdc20.

Fecundación

En la **fecundación**, el espermatozoide se une a un receptor en la superficie del óvulo y se fusiona con la membrana plasmática de éste, comenzando así el desarrollo de un nuevo organismo diploide que contiene información genética de ambos progenitores (**Fig. 17.40**). La fecundación no sólo conduce a

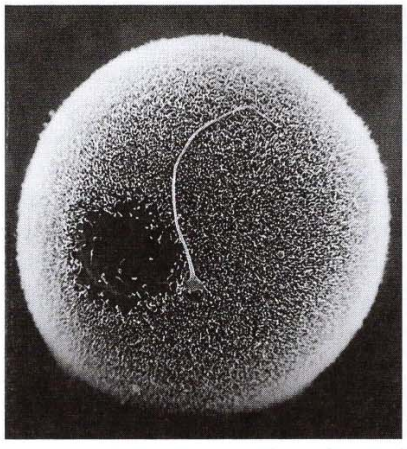


FIGURA 17.40 Fecundación. Micrografía electrónica de barrido de un espermatozoide humano fecundando un óvulo.

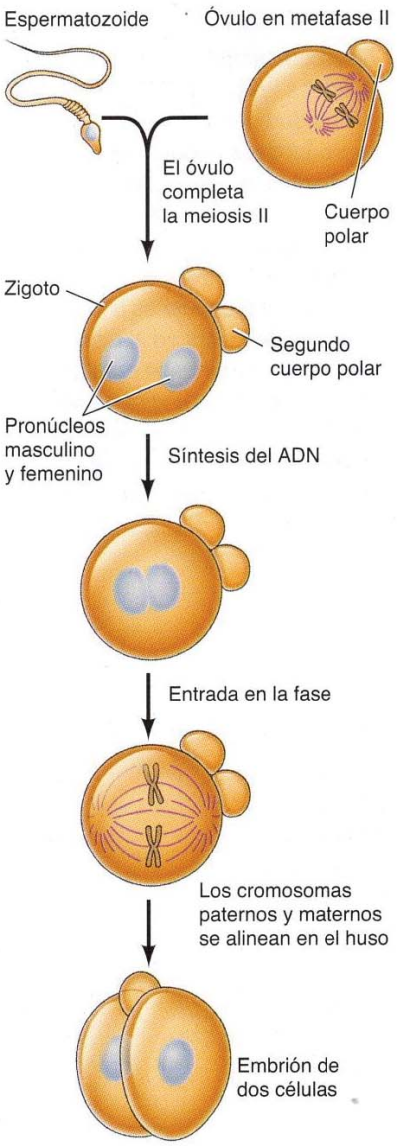


FIGURA 17.41 Fecundación y finalización de la meiosis. La fecundación induce el paso de la metafase II a la anafase II, lo que da lugar a que se complete la meiosis del oocito y a la formación de un segundo cuerpo polar (que normalmente degenera). El núcleo del espermatozoide se descondensa, por lo que el óvulo fecundado (zigoto) contiene dos núcleos haploides (pronúcleos masculino y femenino). En los mamíferos, los pronúcleos replican su ADN a medida que se aproximan. Entonces comienza la mitosis, y los cromosomas procedentes de ambos núcleos se alinean en un huso mitótico común. Por tanto, tras la mitosis y la citocinesis se obtiene un embrión formado por dos células y cada una de ellas contiene un genoma diploide.

que se mezclen los cromosomas paternos y maternos, sino que también induce una serie de cambios en el citoplasma del óvulo que son críticos para el desarrollo posterior. Estos cambios activan al óvulo, lo que hace que se complete la meiosis del oocito y que comiencen los ciclos celulares mitóticos del embrión temprano.

Una señal fundamental, debida a la unión del espermatozoide a su receptor en la membrana plasmática del óvulo, es el aumento en el nivel de Ca^{2+} en el citoplasma del óvulo, lo que posiblemente se deba a la activación de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) (véase Fig. 16.36). Un efecto de este aumento de Ca^{2+} intracelular es la inducción de alteraciones en la superficie que impiden la entrada de más espermatozoides en el óvulo. Este es un proceso fundamental para asegurar que se forma un embrión diploide normal, puesto que el óvulo permanece expuesto a un elevado número de espermatozoides. Se piensa que estas alteraciones se deben, al menos en parte, a la exocitosis inducida por Ca^{2+} de vesículas secretoras que abundan debajo de la membrana plasmática del óvulo. La liberación de los contenidos de estas vesículas altera la cubierta extracelular del óvulo, de tal manera que se bloquea la entrada de otros espermatozoides.

El aumento del Ca^{2+} citosólico tras la fecundación también es una señal para que se complete la meiosis (**Fig. 17.41**). En los óvulos que permanecen detenidos en la metafase II, la transición de metafase a anafase se pone en marcha mediante la activación del complejo promotor de la anafase APC/C, resultando de la fosforilación degradación Ca^{2+}-dependiente del inhibidor del APC/C Emi2/Erp1 que se ocupa de mantener la detención de la metafase II (véase Fig. 17.39). La degradación resultante de ciclina B y condensina da lugar a la compleción de la segunda división meiótica, teniendo lugar una citocinesis asimétrica (al igual que en la meiosis I) y produciendo un segundo cuerpo polar pequeño.

Una vez que se ha completado la meiosis del oocito, el óvulo fecundado (ahora denominado **zigoto**) contiene dos núcleos haploides (denominados **pronúcleos**), cada uno proveniente de un progenitor. En los mamíferos, los dos pronúcleos entran en fase S y replican su ADN a la vez que migran el uno hacia el otro. Cuando se encuentran, el zigoto entra en la fase M de su primera división mitótica. Las dos envueltas nucleares se rompen, y los cromosomas condensados de origen paterno y materno se alinean en un mismo huso. El resultado al finalizar la mitosis son dos células embrionarias, cada una con un genoma diploide nuevo. Entonces comienza la serie de divisiones celulares que, en último término, dará lugar al desarrollo de un nuevo organismo.

RESUMEN

Ciclo celular eucariota

Fases del ciclo celular: El ciclo celular de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, G_1, S, y G_2. La fase M consiste en la mitosis, a la que suele seguir la citocinesis. La fase S es el período de la replicación del ADN.

Ver Animaciones 17.1, 17.2 y Vídeo 17.1

PALABRAS CLAVE: **mitosis, interfase, citocinesis, fase M, fase G_1, fase S, fase G_2, citómetro de flujo, separador celular de fluorescencia**

Regulación del ciclo celular por el crecimiento celular y por señales extracelulares: Las señales extracelulares y el tamaño de la célula regulan la progresión a través de los puntos de control específicos del ciclo celular.

Ver Vídeo 17.2

PALABRAS CLAVE: **START, punto de restricción, G_0**

Puntos de control del ciclo celular: Los puntos de control y el control por retroalimentación coordinan los procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular y detienen el transcurso del ciclo celular si el ADN resulta dañado.

Ver Animación 17.3

PALABRAS CLAVE: **punto de control del ciclo celular, punto de control de lesiones al ADN, punto de control del ensamblaje del huso**

Reguladores de la progresión del ciclo celular

Proteínas quinasas y la regulación del ciclo celular: El MPF es la molécula clave responsable de regular el paso de G_2 a M en todos los eucariotas. La MPF es un dímero de proteína quinasa Cdk1 y ciclina B.

Ver Animación 17.4

PALABRAS CLAVE: **factor promotor de la maduración (MPF), Cdk1, ciclina, complejo de promoción de anafase/ciclosoma (APC/C)**

Familias de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas: Distintas parejas constituidas por ciclinas y proteína quinasas relacionadas con Cdk1 regulan la progresión a través de las diferentes etapas del ciclo celular. La actividad de las Cdk se regula mediante su asociación con las ciclinas, mediante fosforilaciones activadoras e inhibidoras, y mediante la unión de inhibidores de Cdk.

PALABRAS CLAVE: **G_1, ciclina, Cln, Cdk, Inhibidor de Cdk (CKI)**

Factores de crecimiento y la regulación de las Cdk de G_1: Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de las células animales induciendo la síntesis de ciclinas de tipo D. Entonces los complejos Cdk4, 6/ciclina D intervienen llevando a las células a través del punto de restricción en G_1. Un sustrato clave de los complejos Cdk4, 6/ciclina D es la proteína supresora de tumores Rb, que regula la transcripción de genes que requieren la progresión del ciclo celular, incluyendo la ciclina E. La activación de los complejos de Cdk2/ciclina E es, por tanto, responsable de la entrada en la fase S.

PALABRAS CLAVE: **Rb, gen supresor de tumores, E2F**

Fase S y regulación de replicación de ADN: La Cdk2/ciclina E, junto con la proteína quinasa DDK, inicia la replicación de ADN activando la MCM helicasa en los orígenes de replicación. Una vez activada la MCM, el reinicio de la replicación se evita mediante una alta actividad de Cdk hasta que la célula haya completado la mitosis.

Puntos de control de lesiones en el ADN: El ADN lesionado o incompletamente replicado detiene la progresión del ciclo celular en G_1, S y G_2. La detención del ciclo celular está mediada por proteínas quinasas que son activadas por lesiones en el ADN e inhiben las Cdc25 fosfatasas, que son necesarias para la activación de las Cdk. En las células de mamífero, la detención en el punto de control de G_1 también está mediada por p53, que induce la síntesis del inhibidor de Cdk p21.

PALABRAS CLAVE: **ATM, ATR, quinasa de punto de control, p53**

Acontecimientos de la fase M

Etapas de la mitosis: Clásicamente, la mitosis se divide en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Los procesos fundamentales de la mitosis incluyen la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, la rotura de la envuelta nuclear, y la unión de los microtúbulos del huso al cinetocoro de los cromosomas. Entonces las cromátidas hermanas se separan y migran a los polos opuestos del huso. Por último, se vuelven a formar los núcleos, los cromosomas se descondensan y la citocinesis divide a la célula en dos.

Ver Animación 17.5 y Vídeos 17.3 y 17.4

PALABRAS CLAVE: **profase, metafase, anafase, telofase, centrómero, cinetocoro, centrosoma, huso mitótico, prometafase**

RESUMEN

Paso a la mitosis: La fase M comienza por la activación del Cdk1/ciclina B, Aurora y tipo Polo, responsables de la condensación de la cromatina, rotura de la cubierta nuclear, fragmentación del aparato de Golgi, y reorganización de los microtúbulos para formar el huso mitótico. La activación de Cdk1/ciclina B es responsable de la condensación de la cromatina, de la rotura de la envuelta nuclear, de la fragmentación del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, y de la reorganización de los microtúbulos para formar el huso mitótico. El anclaje de los microtúbulos del huso a los cinetocoros de las cromátidas hermanas conducirá a que éstas se alineen en la placa metafásica.

condensina, cohesina, Aurora quinasa, quinasa semejante a Polo

El punto de control de ensamblaje del huso y progresión hacia anafase: La activación de una APC/C ubiquitina ligasa provoca la degradación de proteínas reguladoras clave en la transición de la metafase a la anafase. La actividad del complejo promotor de la anafase está inhibida hasta que la célula supera el punto de control de ensamblaje del huso y todos los cromosomas se encuentran correctamente alineados sobre el uso. La proteólisis mediada por ubiquitinas, que la inició el complejo promotor de la anafase, induce la degradación de la cohesina, lo que rompe la unión entre las cromátidas hermanas al inicio de la anafase. El complejo promotor de la anafase APC/C también ubiquitiliza a la ciclina B, desencadenando la activación de Cdk1 y la salida de la mitosis.

complejo de punto de control mitótico (MCC)

Ver Vídeos 17.5 y 17.6

Citocinesis: La inactivación del Cdk1/ciclina B también induce la citocinesis. En las células animales la citocinesis se produce debido a la contracción de un anillo constituido por filamentos de actina y miosina. En las células de los vegetales superiores la citocinesis se lleva a cabo mediante la formación de una pared celular y de una membrana plasmática nueva en el interior de la célula.

anillo contráctil

Ver Animación 17.6

Meiosis y fecundación

Proceso de la meiosis: La meiosis es un ciclo celular especializado que da lugar a células hijas haploides. A una única ronda de replicación del ADN le siguen dos divisiones celulares consecutivas. Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos primero se aparean y luego segregan a células hijas diferentes. La meiosis II se asemeja a una mitosis normal, en la que se separan las cromátidas hermanas.

meiosis, leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno, diacinesis, sinapsis, complejo sinaptonémico, quiasma

Ver Animaciones 17.7, 17.8 y 17.9

Regulación de la meiosis en los oocitos: La meiosis de los oocitos de los vertebrados se regula en dos únicos sitios del ciclo celular: en la fase de diploteno en la meiosis I, y en la metafase en la meiosis II. La detención en la metafase II se debe a que el factor promotor de la mitosis es inhibido por una proteína quinasa que se expresa en los oocitos.

cuerpo polar, factor citostático (CSF), Mos

Ver Animación 17.10

Fecundación: La fecundación induce la reanudación de la meiosis en el oocito mediante una activación, dependiente de Ca^{2+}, del complejo promotor de la anafase APC/C. El óvulo fecundado contendrá dos núcleos haploides que formarán un nuevo genoma diploide, y comenzarán las divisiones celulares embrionarias.

fecundación, zigoto, pronúcleo

PALABRAS CLAVE

Preguntas

1. ¿En qué se parecen las células en G_0 y G_1? ¿En qué difieren?
2. La radiación daña al ADN y detiene la progresión del ciclo celular en puntos de control en G_1, S y G_2. ¿Por qué resulta ventajoso para las células dañadas?
3. ¿Cuáles son los mecanismos que regulan la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk's)?
4. El punto de control del huso retrasa el comienzo de la anafase hasta que todos los cromosomas se encuentran correctamente alineados sobre el huso. ¿Cuál sería el resultado si un fallo de este punto de control permitiese que se iniciara la anafase mientras uno de los cromosomas todavía se encontrase unido a los microtúbulos de un único centrosoma?
5. ¿Qué procesos celulares se verían afectados por la expresión de ARNsi dirigido frente a Cdk7?
6. El inhibidor de Cdk, p16, se une de manera específica a los complejos Cdk4, 6/ciclina D. ¿Cuál sería el efecto esperado de una sobreexpresión de p16 sobre la progresión del ciclo celular? ¿Afectaría la sobreexpresión de p16 a una célula tumoral que careciera de la proteína Rb funcional?
7. La mutagénesis *in vitro* de ADNc de lámina clonados se ha utilizado para producir mutantes que no pueden ser fosforilados por Cdk1. ¿Cómo afectaría la expresión de estas lamininas mutantes a la ruptura de la envuelta nuclear al final de la profase?
8. ¿Qué sustratos son fosforilados por Cdk1/ciclina B para iniciar la mitosis?
9. Se han generado mutantes de la ciclina B que son resistentes a la ubiquitilación por la proteasa ciclosoma (APC/C) de la ciclina B. ¿Cómo afectaría la expresión de estas ciclinas B mutantes a la transición de la metafase a la anafase?
10. ¿Cómo desencadena la actividad del complejo promotor de la anafase ciclosoma (APC/C) la separación de las cromátidas hermanas?
11. Se ha utilizado la recombinación homóloga para inactivar el gen *mos* en ratones. ¿Qué se esperaría que causara esto en la meiosis de los oocitos?

Bibliografía

Referencias generales

(Los artículos de revisión más importantes para cada sección se han resaltado en negrita).

Ciclo celular eucariota

Cimprich, K. A. and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 616–627. [R]

Forsburg, S. L. and P. Nurse. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 227–256. [R]

Harper, J. W. and S. J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28: 739–745. [R]

Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629–634. [R]

Jackson, S. P. and J. Bartek. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071–1078. [R]

Morgan, D. O. 2007. *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press: London.

Norbury, C. and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 441–470. [R]

Pardee, A. B. 1989. G1 events and the regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603–608. [R]

Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 23: 399–402. [R]

Reguladores de la progresión del ciclo celular

Arias, E. E. and J. C. Walter. 2007. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 21: 497–518. [R]

Blow, J. J. and A. Dutta. 2005. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 476–486. [R]

Besson, A., S. F. Dowdy and J. M. Roberts. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14: 159–169. [R]

Bloom, J. and F. R. Cross. 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 149–159. [R]

Boutros, R., V. Lobjois and B. Ducommun. 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature Rev. Cancer* 7: 495–507. [R]

Bracken, A. P., M. Ciro, A. Cocito and K. Helin. 2004. E2F target genes: Unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29: 409–417. [R]

Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y. and G. Leone. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Rev. Cancer* 9: 785–797. [R]

Dick, F. A. and S. M. Rubin. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 297–306. [R]

Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389–396. [P]

Harper, J. W. and S. J. Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28: 739–745. [R]

Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti and M. Culotti. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267–287. [P]

Hills, S. A. and J. F. X. Diffley. 2014. DNA replication and oncogene-induced replicative stess. *Current Biol.* 24: R435–R444. [R]

Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3009–3013. [P]

Malumbres, M. and M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Rev. Cancer* 9: 153–167. [R]

Masui, Y. and C. L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129–146. [P]

Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* 116: 221–234. [R]

Pines, J. 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 427–438. [R]

Reinhardt, H. C. and M. B. Yaffe. 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opin. Cell Biol.* 21: 245–255. [R]

Sclafani, R. A. and T. M. Holzen. 2007. Cell cycle regulation of DNA replication. *Ann. Rev. Genet.* 41: 237–280. [R]

Smith, L. D. and R. E. Ecker. 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232–247. [P]

Swenson, K. I., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47: 861–870. [P]

Vousden, K. H. and D. P. Lane. 2007. p53 in health and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 275–283. [R]

Acontecimientos de la fase M

Archambault, V. and D. M. Glover. 2009. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 265–275. [R]

Barr, F. A., H. H. W. Sillje and E. A. Nigg. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 429–440. [R]

Carmena, M. and W. C. Earnshaw. 2003. The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 842–854. [R]

Cheeseman, I. M. and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 33–45. [R]

De Gramont, A. and O. Cohen-Fix. 2005. The many phases of anaphase. *Trends Biochem. Sci.* 30: 559–568. [R]

Foley, E. A. and T. M. Kapoor. 2013. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 25–37. [R]

Glotzer, M. 2005. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307: 1735–1739. [R]

Guttinger, S., E. Laurell and U. Kutay. 2009. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 178–191. [R]

Jongsma, M. L. M., I. Berlin and J. Neefjes. 2015. On the move: organelle dynamics during mitosis. *Trends Cell Biol.* 25: 112–124. [R]

Jurgens, G. 2005. Plant cytokinesis: Fission by fusion. *Trends Cell Biol.* 15: 277–283. [R]

Kline-Smith, S. L. and C. E. Walczak. 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: Refocusing on microtubule dynamics. *Mol. Cell* 15: 317–327. [R]

Lara-Gonzalez, P., F. G. Westhorpe and S. S. Taylor. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Current Biol.* 22: R966–R980. [R]

Lens, S. M. A., E. E. Voest and R. H. Medema. 2010. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 825–841. [R]

Losada, A. and T. Hirano. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19: 1269–1287. [R]

Lowe, M. and F. A. Barr. 2007. Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 429–439. [R]

Ma, H. T. and R. Y. C. Poon. 2011. How protein kinases coordinate mitosis in animal cells. *Biochem. J.* 435: 17–31. [R]

Musacchio, A. and E. D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 379–393. [R]

Peters, J.-M. , A. Tedeschi and J. Schmitz. 2008. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev.* 22: 3089–3114. [R]

Petronczki, M., P. Lenart and J.-M. Peters. 2008. Polo on the rise—from mitotic entry to cytokinesis with Plk1. *Dev. Cell* 14:646–659. [R]

Rieder, C. L. and A. Khodjakov. 2003. Mitosis through the microscope: Advances in seeing inside live dividing cells. *Science* 300: 91–96. [R]

Sivakumar, S. and G. J. Gorbsky. 2015. Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 82–94. [R]

Sullivan, M. and D. O. Morgan. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 894–903. [R]

Walczak, C. E., S. Cai and A. Khodjakov. 2010. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature Mol. Cell Biol.* 11: 91–102. [R]

Wood, A. J., A. F. Severson and B. J. Meyer. 2010. Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions. *Nature Rev. Genet.* 11: 391–404. [R]

Zitouni, S., C. Nabais, S. C. Jana, A. Guerrero and M. Bettencourt-Dias. 2014. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 433–452. [R]

Meiosis y fecundación

Baudat, F., Y. Imai and B. de Massy. 2013. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Rev. Genet.* 14: 794–806. [R]

Bhalla, N. and A. F. Dernburg. 2008. Prelude to a division. *Ann. Rev. Cell Biol.* 24: 397–424. [R]

Clift, D. and M. Schuh. 2013. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 549–562. [R]

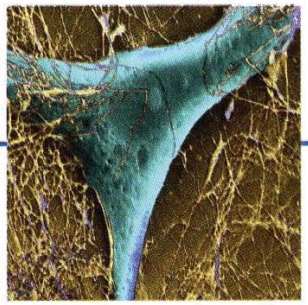
Hawley, R. S. and W. D. Gilliland. 2009. Homologue pairing: getting it right. *Nature Cell Biol.* 11: 917–918. [R]

Page, S. L. and R. S. Hawley. 2003. Chromosome choreography: The meiotic ballet. *Science* 301: 785–789. [R]

Pawlowski, W. P. and W. Z. Cande. 2005. Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol.* 15: 674–681. [R]

Pesin, J. A. and T. L. Orr-Weaver. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Ann. Rev. Cell Biol.* 24: 475–499. [R]

Petronczki, M., M. F. Siomos and K. Nasmyth. 2003. Un ménage à quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423–440. [R]



Capítulo 18

Muerte y renovación celular

Muerte celular programada 691

Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos 702

Células madre pluripotenciales, reprogramación celular y medicina regenerativa 713

EXPERIMENTO CLAVE: Identificación de los genes necesarios para la muerte celular programada 694

EXPERIMENTO CLAVE: Cultivo de células madre embrionarias 712

La muerte celular y la proliferación celular están equilibradas durante la vida de los organismos multicelulares. El desarrollo animal comienza con la rápida proliferación de las células embrionarias, que a continuación se diferencian para producir los diversos tipos de células especializados que componen los tejidos y órganos adultos. Mientras que el nematodo *C. elegans* consiste en tan solo 959 células somáticas, los humanos poseen un total de aproximadamente 10^{14} células, consistiendo en más de 200 tipos celulares diferenciados. Empezando a partir de una sola célula —el ovocito fertilizado— todos los diversos tipos celulares del cuerpo son producidos y organizados para formar tejidos y órganos. Este complejo proceso de desarrollo implica no sólo la proliferación y diferenciación celular, sino también la muerte celular. A pesar de que las células pueden morir como resultado de eventos traumáticos impredecibles, como la exposición a agentes químicos tóxicos, la mayoría de las muertes celulares en los organismos multicelulares ocurren como consecuencia de un proceso fisiológico normal de muerte celular programada, que juega un papel clave tanto en el desarrollo embrionario y en tejidos adultos.

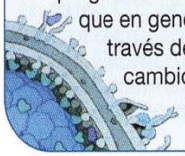
En los organismos adultos, la muerte celular debe estar equilibrada con la renovación celular, y la mayoría de los tejidos contienen células madre que son capaces de reemplazar las células que se han perdido. Las anomalías de la muerte celular están asociadas con una amplia variedad de patologías, incluyendo el cáncer, las patologías autoinmunes y los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer. Por el contrario, la capacidad de las células madre de proliferar y diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares ha generado un gran interés en su posible uso, para reemplazar tejidos dañados. Los mecanismos y la regulación de la muerte celular y la renovación celular se han convertido, por tanto, en áreas de investigación en la cabeza de la biología y la medicina.

Muerte celular programada

La **muerte celular programada** es estrechamente regulada, de modo que el destino de las células individuales cumple las necesidades del organismo completo. En adultos, la muerte celular es responsable del equilibrio entre proliferación celular y el mantenimiento de números celulares constantes en los tejidos que sufren renovación ulular. Por ejemplo, unas 5×10^{11} células sanguíneas son eliminadas diariamente en el hombre mediante muerte celular programada, equilibrando su continua producción en la médula ósea. Adicionalmente, la muerte celular programada proporciona un mecanismo de defensa por el cual las células dañadas y potencialmente peligrosas pueden ser eliminadas por el bien del organismo. Las células infectadas por virus con frecuencia sufren muerte celular programada, previniendo así

VÍDEO 18.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v18.1



Apoptosis. La muerte celular programada es un proceso activo que en general tiene lugar a través de distintas series de cambios celulares conocidas como apoptosis.

la producción de nuevas partículas virales y limitando la propagación del virus a través del organismo hospedador. Otros tipos de agresiones celulares, como las lesiones del ADN, también inducen la muerte celular programada. En el caso del ADN lesionado, la muerte celular programada puede eliminar células que portan mutaciones potencialmente dañinas, incluyendo células con mutaciones que pueden dar lugar al desarrollo de cáncer.

Durante el desarrollo, la muerte celular programada juega un papel clave eliminando las células no deseadas de una variedad de tejidos. Por ejemplo, la muerte celular programada es responsable de la eliminación de los tejidos larvales durante la metamorfosis de anfibios e insectos, además de la eliminación de tejido interdigital durante la formación de los dedos. Otro ejemplo bien caracterizado de la muerte celular programada es proporcionado por el desarrollo del sistema nervioso en mamíferos. Las neuronas se producen en exceso, y hasta un 50% de las neuronas en desarrollo son eliminadas mediante muerte celular programada. Aquellas que sobreviven son seleccionadas por haber realizado las conexiones correctas con sus células diana, que secretan factores de crecimiento que señalizan la supervivencia mediante el bloqueo del programa de muerte celular neuronal. La supervivencia de muchos otros tipos de células en animales, depende, de forma similar, de factores de crecimiento o de contactos con células vecinas o la matriz extracelular, de modo que se cree que la muerte celular programada juega un papel importante en la regulación de las asociaciones entre células en los tejidos.

Los eventos de la apoptosis

En contraste con la muerte accidental de las células que resulta de una lesión aguda (**necrosis**), la muerte celular programada es un proceso activo, que tiene lugar generalmente mediante una serie concreta de cambios celulares conocidos como **apoptosis**, descrita por primera vez en 1972 (**Fig. 18.1**). Du-

◆ El término apoptosis deriva de la palabra griega que describe la caída de las hojas desde un árbol o los pétalos de una flor. Se tomó para diferenciar esta forma de muerte celular programada de las muertes celulares accidentales causadas por la inflamación o las lesiones.

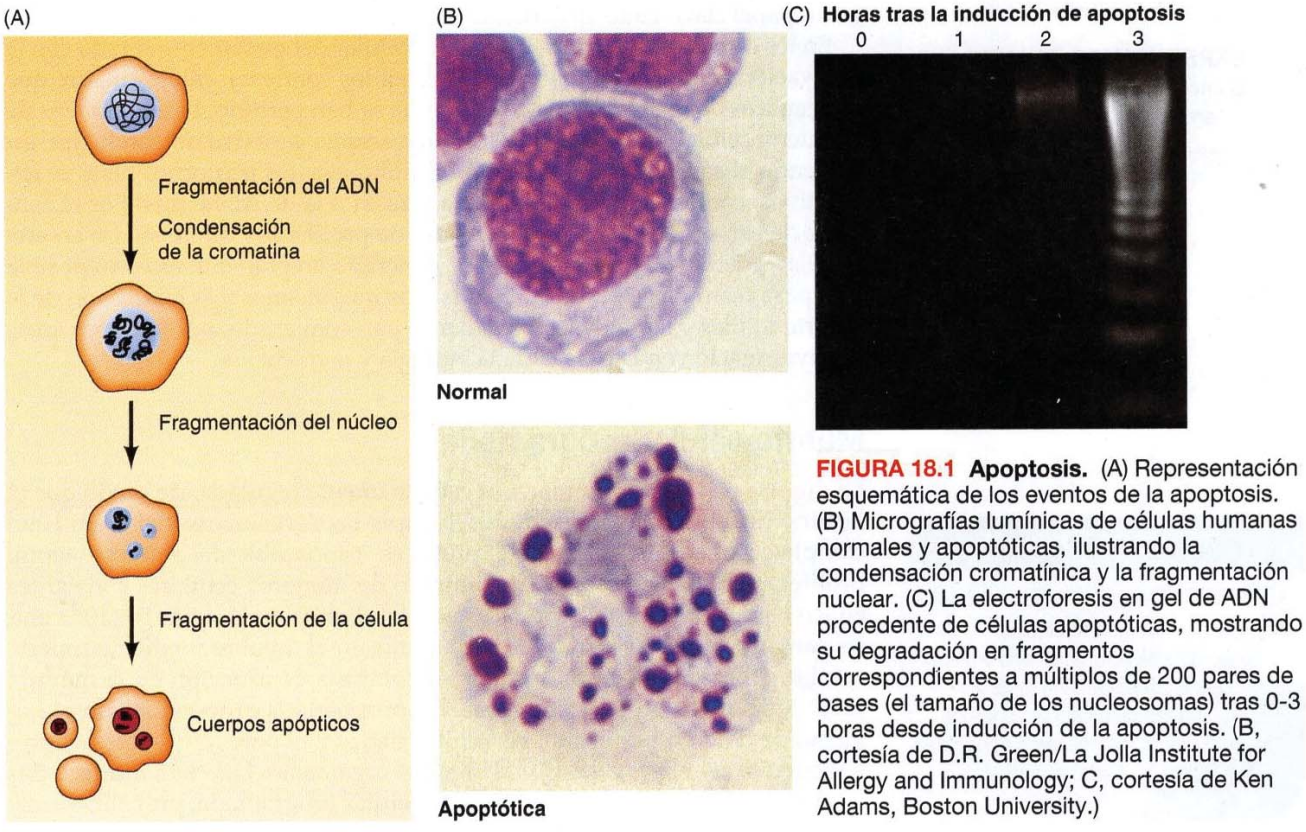


FIGURA 18.1 Apoptosis. (A) Representación esquemática de los eventos de la apoptosis. (B) Micrografías lumínicas de células humanas normales y apoptóticas, ilustrando la condensación cromatínica y la fragmentación nuclear. (C) La electroforesis en gel de ADN procedente de células apoptóticas, mostrando su degradación en fragmentos correspondientes a múltiplos de 200 pares de bases (el tamaño de los nucleosomas) tras 0-3 horas desde inducción de la apoptosis. (B, cortesía de D.R. Green/La Jolla Institute for Allergy and Immunology; C, cortesía de Ken Adams, Boston University.)

ANIMACIÓN 18.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a18.1

Apoptosis. Durante la apoptosis, el ADN cromosómico generalmente es fragmentado, la cromatina se condensa, el núcleo se fragmenta y la célula se encoge y se rompe formando los cuerpos apoptóticos.

rante la apoptosis, el ADN cromosómico generalmente es fragmentado como resultado de la escisión entre nucleosomas. La cromatina se condensa y a continuación el núcleo se disgrega en pequeños fragmentos. Finalmente, la célula encoge y se rompe en fragmentos envueltos de membrana denominados cuerpos apoptóticos.

Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son reconocidos de forma eficaz y fagocitados mediante macrófagos y células vecinas, de modo que las células que mueren por apoptosis son rápidamente retiradas de los tejidos. Por el contrario, las células que mueren debido a necrosis como resultado de una lesión aguda se hinchan y se lisan, liberando su contenido al espacio extracelular y causando inflamación. La eliminación de células apoptóticas está mediada por la expresión de las señales denominadas «cómeme» presentes en la superficie celular. Estas señales incluyen a la fofatidilserina, que normalmente está restringida a la cara interna de la membrana plasmática (véase Fig. 14.2). Durante la apoptosis, la fosfatidilserina se expresa en la superficie celular donde es reconocida por receptores expresados en las células fagocíticas (**Fig. 18.2**).

Estudios pioneros de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans* proporcionaron conocimientos iniciales críticos que permitieron la comprensión del mecanismo molecular de la apoptosis. Estos estudios llevados a cabo en el laboratorio de Robert Horvitz inicialmente identificaron tres genes que juegan papeles clave en la regulación y ejecución de la apoptosis. Durante el desarrollo normal del nematodo, 131 células somáticas de un total de 1090 son eliminadas mediante muerte celular programada, dando lugar a 959 células somáticas en el organismo adulto. La muerte de estas células es altamente específica, de modo que las mismas células siempre mueren en los embriones en desarrollo. Basándose en esta especificidad del desarrollo, Horvitz comenzó el análisis genético de la muerte celular en *C. elegans* con la meta de identificar los genes responsables de estas

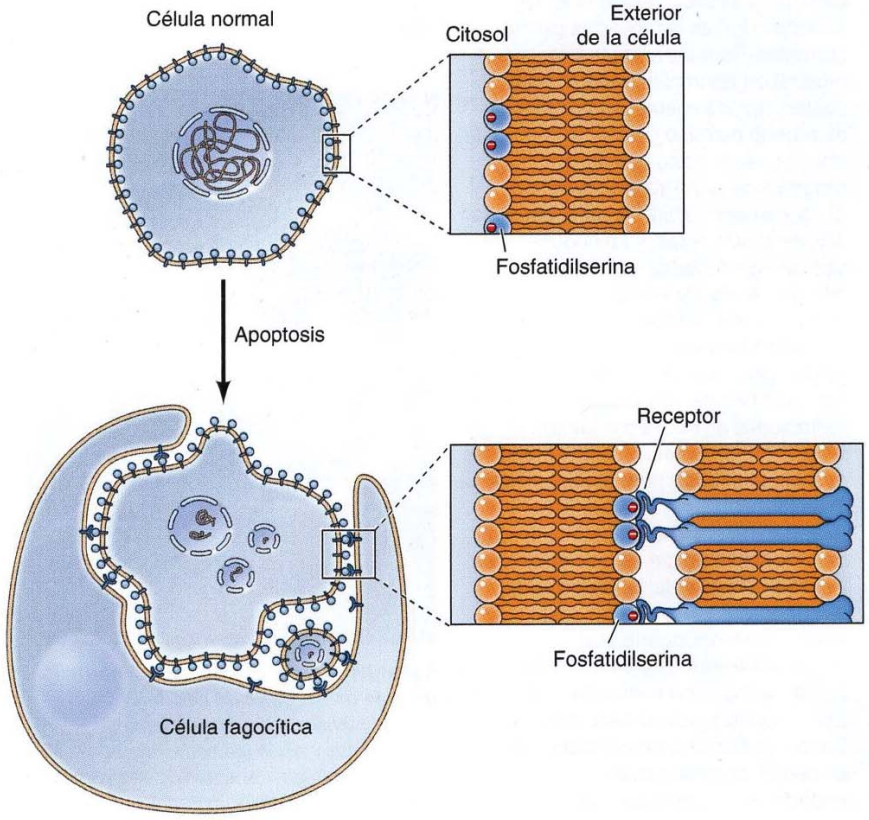
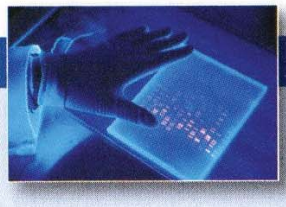


FIGURA 18.2 Fagocitosis de las células apoptóticas. Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son reconocidos y englobados por células fagocíticas. Una de las señales reconocidas por los fagocitos es la presencia de fosfatidilserina en la superficie celular. En las células normales, la fosfatidilserina está restringida a la membrana interna de la membrana plasmática, pero se expresa en la superficie celular durante la apoptosis.



EXPERIMENTO CLAVE

Identificación de los genes necesarios para la muerte celular programada

Control genético de la muerte celular programada en el nematodo *C. elegans*

Hilary M. Ellis y H. Robert Horvitz
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA

Cell, 1986, Volumen 44, págs. 817-829

Contexto

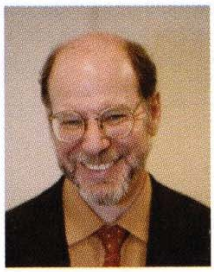
A partir de los años 1960 la muerte celular se reconocía como un evento normal durante el desarrollo animal, lo que implicaba que era un proceso estrechamente regulado en que células específicas estaban destinadas a morir. El nematodo sencillo *C. elegans*, que ha sido un sistema modelo de importancia crítica en la biología del desarrollo, resultó ser la clave de la comprensión tanto de la regulación como del mecanismo de dichas muertes celulares programadas. El análisis microscópico durante los años 1970 estableció un mapa completo del desarrollo de *C. elegans* de modo que el origen embrionario y el destino de cada una de las células era conocido. Notablemente, el desarrollo de *C. elegans* incluía un patrón muy específico de muertes celulares programadas. En particular, John Sulston y H. Robert Horvitz describieron en 1977 que el desarrollo de los nematodos adultos (formados por 959 células somáticas) implicaba la muerte programada de 131 células de las 1.090 que eran producidas inicialmente. Las mismas células morían en todos los embriones, indicando que la muerte de estas células era un evento normal durante el desarrollo, donde la muerte celular era un destino específico del desarrollo. También era notable que todas estas células moribundas sufrieran una serie de cambios morfológicos similares, lo que sugería que estas muertes celulares programadas ocurrían mediante un mecanismo común.

Basándose en estas consideraciones, Horvitz realizó un análisis genético con el objetivo de caracterizar el mecanismo y la regulación de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*. En los experimentos descritos en su trabajo de 1986, Hilary Ellis y Horvitz identificaron dos genes que eran necesarios para que se produjeran todas las muertes celulares programadas durante el desarrollo del nematodo. La identificación y caracterización de estos genes fue un primer paso crítico que desencadenó la comprensión actual de la biología molecular de la apoptosis.

Experimento

Las células que están sufriendo muerte celular programada en *C. elegans* pueden identificarse de forma sencilla como células altamente refringentes bajo examen microscópico, de forma que Ellis y Horvitz pudieron emplear esta característica como ensayo para detectar animales mutantes en los que no se producían las muertes celulares normales. Para aislar mutantes que mostraban anomalías en la muerte celular, trataron nematodos con el mutágeno químico metanosulfonato de etilo, que reacciona con el ADN. La progenie de aproximadamente 4.000 gusanos fue examinada para identificar células moribundas, y se encontraron dos cepas mutantes en las que la muerte celular esperada no tenía lugar (véase figura). Ambas cepas mutantes contenían mutaciones recesivas en el mismo gen, que se denominó *ced-3*. Estudios posteriores indicaron que las mutaciones en *ced-3* bloqueaban todas las 131 muertes celulares programadas que tendrían lugar normalmente durante el desarrollo.

Estudios continuados identificaron una mutación adicional que era similar a *ced-3* en inhibir la muerte celular programada. Sin embargo, esta mutación se encontraba en un gen diferente, que se localizaba en un cromosoma distinto a *ced-3*. Este segundo gen se denominó *ced-4*. De forma similar a las mutaciones en *ced-3*, se observó que las mutaciones recesivas en *ced-4* bloqueaban todas las muertes celulares programadas en el gusano.

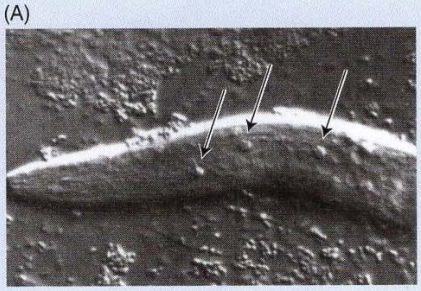


H. Robert Horvitz

Impacto

El aislamiento de mutantes de *C. elegans* por Ellis y Horvitz constituyeron la primera identificación de genes que estaban implicados en el proceso de la muerte celular programada. Las proteínas codificadas por los genes *ced-3* y *ced-4*, además de por el gen *ced-9* (que fue identificado posteriormente por Horvitz y sus colaboradores), resultaron ser prototipos de reguladores y efectores

(A)



(B)

Fotomicrografías de un gusano normal (A) y de un mutante de ced-3 (B). *Las células moribundas son altamente refringentes y están indicadas mediante flechas en el panel A. Estas células no están presentes en el animal mutante.*

EXPERIMENTO CLAVE

centrales de la apoptosis que están altamente conservados a lo largo de la evolución. La clonación y secuenciación de *ced-3* reveló que estaba relacionado con una proteasa que había sido identificada previamente en células de mamífero, y que se convirtió en el primer miembro de la familia de las caspasas. El gen *ced-9* de *C. elegans* se relacionó con el oncogén *bcl-2*, aislado por primera vez a partir de un linfoma humano de células B, que poseía la característica infrecuente de inhibir la apoptosis en lugar de estimular la proliferación celular. Y se encontró que *ced-4* codificaba una proteína adaptadora relacionada con la proteína Apaf-1 de mamíferos, que es necesaria para la activación de las caspasas. La identificación de estos genes en *C. elegans* desencadenó así la comprensión de la base molecular de la apoptosis, con amplias implicaciones tanto para el desarrollo como para el mantenimiento de los tejidos adultos normales. Desde que anomalías en la apoptosis contribuyen a una amplia variedad de patologías, incluyendo el cáncer, las patologías autoinmunes y los trastornos neurodegenerativos, los hallazgos iniciales de Ellis y Horvitz han tenido impacto sobre amplias áreas de la biología y la medicina.

muertes celulares en el desarrollo. En 1986 la mutagénesis de *C. elegans* identificó dos genes (*ced-3* y *ced-4*), que eran necesarios para la muerte celular durante el desarrollo. Si *ced-3* o *ced-4* eran inactivados mediante una mutación, la muerte celular programada no tenía lugar. Un tercer gen, *ced-9*, funcionaba como un regulador negativo de la apoptosis. Si *ced-9* era inactivado mediante una mutación, las células que normalmente sobrevivirían no lo hacían, sino que sufrían apoptosis, desencadenando la muerte del animal en desarrollo. Por el contrario, si *ced-9* era expresado a niveles muy elevados, la muerte celular programada normal no ocurría. Estudios posteriores indicaron que las proteínas codificadas por estos genes actuaban en una vía en la que Ced-4 actuaba para estimular a Ced-3, y Ced-9 inhibía a Ced-4 (**Fig. 18.3**). Genes semejantes a *ced-3, ced-4* y *ced-9* también han sido identificados en *Drosophila* y en mamíferos, y se ha descubierto que codifican proteínas que representan efectores y reguladores de la apoptosis conservados, inducidos por diversos estímulos.

Caspasas: Los ejecutores de la apoptosis

La clonación molecular y la secuenciación nucleotídica del gen *ced-3* indicaron que codificaba una proteasa, proporcionando la primera señal sobre el mecanismo molecular de la apoptosis. Actualmente se sabe que Ced-3 es un prototipo de una familia de más de una docena de proteasas, conocidas como **caspasas** porque poseen residuos de cisteína (C) en sus centros activos y escinden detrás de residuos de ácido aspártico (Asp) en sus proteínas sustrato. Las caspasas son los últimos efectores o ejecutores de la muerte celular programada, desencadenando los eventos de la apoptosis mediante la escisión de más de 100 proteínas diana diferentes (**Fig. 18.4**). Una diana clave de las caspasas incluyen un inhibidor de una ADNasas, que cuando está activada es responsable de la fragmentación del ADN nuclear. Adicionalmente, las caspasas escinden ambas láminas nucleares, dando lugar a la fragmentación del núcleo, y las proteínas citoesqueléticas, desencadenando la desorganización del citoesqueleto, la vesiculización de la membrana y la fragmentación celular; y las proteínas de matriz del Golgi, lo que induce la fragmentación de este aparato. Las caspasas también escinden y activan una «escramblasa» que transloca la fosfatidilserina desde la cara interna a la externa de la membrana plasmática.

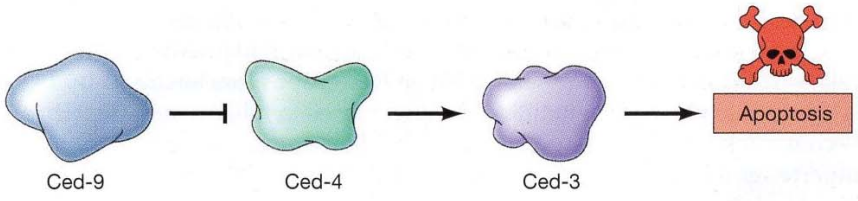


FIGURA 18.3 Muerte celular programada en *C. elegans*. El análisis genético identificó tres genes que juegan papeles clave en la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*. Dos genes, *ced-3* y *ced-4*, son necesarios para la muerte celular, mientras que *ced-9* inhibe la muerte celular. La proteína Ced-9 actúa corriente arriba de Ced-4, que activa a Ced-3.

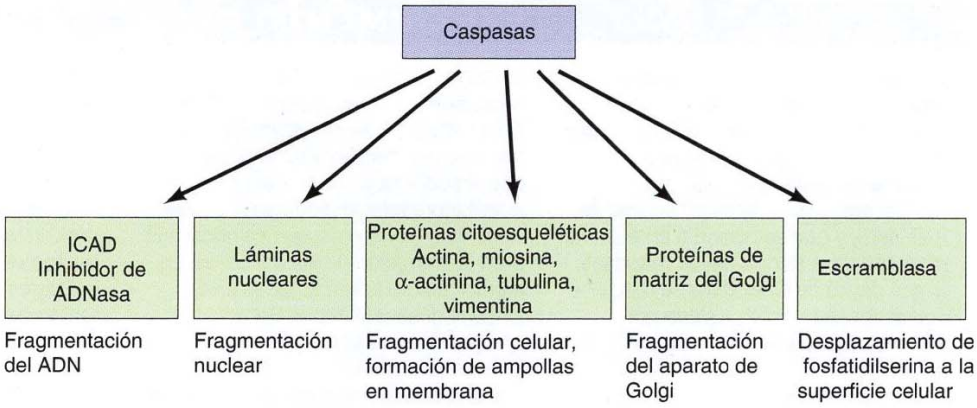


FIGURA 18.4 Dianas de las caspasas. Las caspasas escinden a más de 100 proteínas celulares para inducir los cambios morfológicos típicos de la apoptosis. Entre las dianas de las caspasas figuran un inhibidor de ADNasa (ICAD), láminas nucleares, proteínas del citoesqueleto, proteínas de matriz del Golgi, y una escramblasa que promueve la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática.

Ced-3 es la única caspasa de *C. elegans*. Sin embargo, en *Drosophila* y los mamíferos se han identificado, al menos, siete caspasas, designadas como caspasas *iniciadoras* o *efectoras*, que intervienen en una cascada cuyo resultado final es la apoptosis. Las caspasas se sintetizan en forma de precursores inactivos (llamados procaspasas) que pueden convertirse en su forma activa en una reacción de escisión proteolítica catalizada por otras caspasas. Las caspasas iniciadoras se activan directamente como respuesta a las distintas señales que inducen la apoptosis como se abordará en una sección posterior de este capítulo. A continuación, las caspasas efectoras escinden y activan a las caspasas efectoras, que se ocupan de digerir a las proteínas celulares diana que intervienen en las distintas etapas de la apoptosis (véase Fig. 18.4). Por consiguiente, la activación de una caspasa iniciadora pone en marcha una reacción en cadena de la polimerasa de activación de caspasas que conduce a la muerte de la célula.

El análisis genético en *C. elegans* inicialmente sugería que Ced-4 funcionaba como un activador de la caspasa Ced-3. Estudios subsiguientes han demostrado que Ced-4 y su homólogo en mamíferos (Apaf-1) se une a las caspasas y estimula su activación. Ced-4 y Apaf-1 son controladas por proteínas codificadas por miembros de una gran familia de genes relacionados con el ced-9.

Reguladores centrales de la apoptosis: La familia Bcl-2

El tercer gen identificado como un regulador clave de la muerte celular programada en *C. elegans*, *ced-9*, se encontró que estaba estrechamente relacionado con un gen mamífero denominado *bcl-2*, que fue identificado por primera vez en 1985 como un oncogén que contribuía al desarrollo de los linfomas de células B humanas (cánceres de los linfocitos B). Al contrario que otras proteínas oncogénicas, como Ras, que estimulan la proliferación celular (véase Medicina Molecular, Cap. 16, se descubrió que **Bcl-2** inhibía la apoptosis. Ced-9 y Bcl-2 eran por tanto similares en cuanto a función, y el papel de Bcl-2 como regulador de la apoptosis centró primero la atención sobre la importancia de la supervivencia celular en el desarrollo del cáncer. Como se analizará en el capítulo siguiente, ahora reconocemos que las células cancerosas son generalmente deficientes en el proceso normal de muerte celular programada, y que su incapacidad para sufrir apoptosis es tan importante como su proliferación descontrolada durante el desarrollo de tumores malignos.

Los mamíferos codifican una familia de aproximadamente 20 proteínas relacionadas con Bcl-2, que se dividen en tres grupos funcionales (**Fig. 18.5**). Algunos miembros de la familia Bcl-2 (miembros familiares antiapoptóticos) —como Bcl-2— funcionan como inhibidores de apoptosis y programan la muerte celular. Otros miembros de esta familia, sin embargo, son proteínas

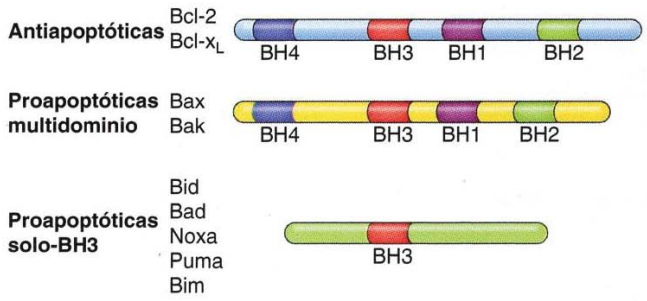


FIGURA 18.5 La familia Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2 se divide en tres grupos funcionales. Las proteínas antiapoptóticas (p. ej., Bcl-2 y Bcl-x_L) y proteínas efectoras proapoptóticas (Bax y Bak) poseen cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1-BH4). Las proteínas proapoptóticas sólo-BH3 (p. ej., Bid, Bad, Noxa, Puma y Bim) tienen únicamente un dominio de homología (BH3).

proapoptóticas que inducen la activación de la caspasa y promueven la muerte celular. Existen dos grupos de dichas proteínas proapoptóticas, que difieren en su función además de en la extensión de su homología con Bcl-2. Bcl-2 y otros miembros antiapoptóticos de la familia comparten cuatro regiones conservadas denominadas dominios de homología con Bcl-2 (BH). Un grupo de miembros proapoptóticos de la familia de las proteínas proapoptóticas poseen solo 4 dominios BH, mientras que el segundo grupo, las proteínas «solo-BH3», solamente poseen el dominio BH3.

El destino de la célula —la vida o la muerte— está determinado por el equilibrio de la actividad proapoptótica y antiapoptótica de los miembros de la familia Bcl-2, que actúan para regularse entre ellos (**Fig. 18.6**). Las proteínas efectoras proapoptóticas, como Bax y Bak, son efectores corriente abajo que inducen directamente la apoptosis. Son inhibidos por interacciones con los miembros *antiapoptóticos* de la familia, como Bcl-2. Los miembros *solo-BH3* de la familia se encuentran corriente arriba de la cascada, y se encuentran regulados mediante señales que inducen la muerte celular (p. ej., lesiones en el ADN) o la supervivencia celular (p. ej., los factores de crecimiento). Una vez activados, los miembros solo-BH3 inician la apoptosis mediante dos mecanismos: (1) antagonizan a los miembros de la familia antiapoptótica Bcl-2 y (2) activan las proteínas efectoras proapoptóticas Bax y Bak.

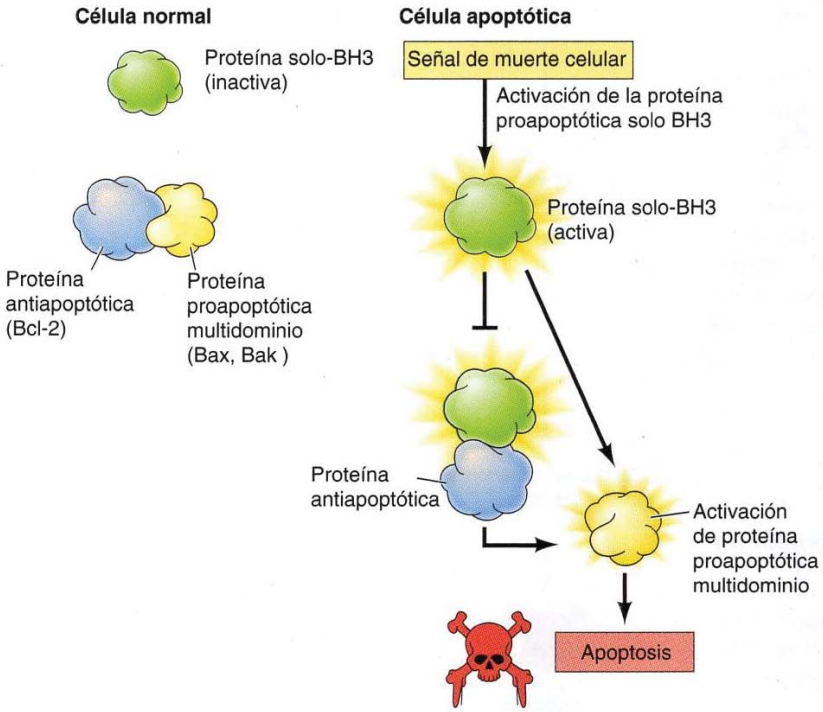
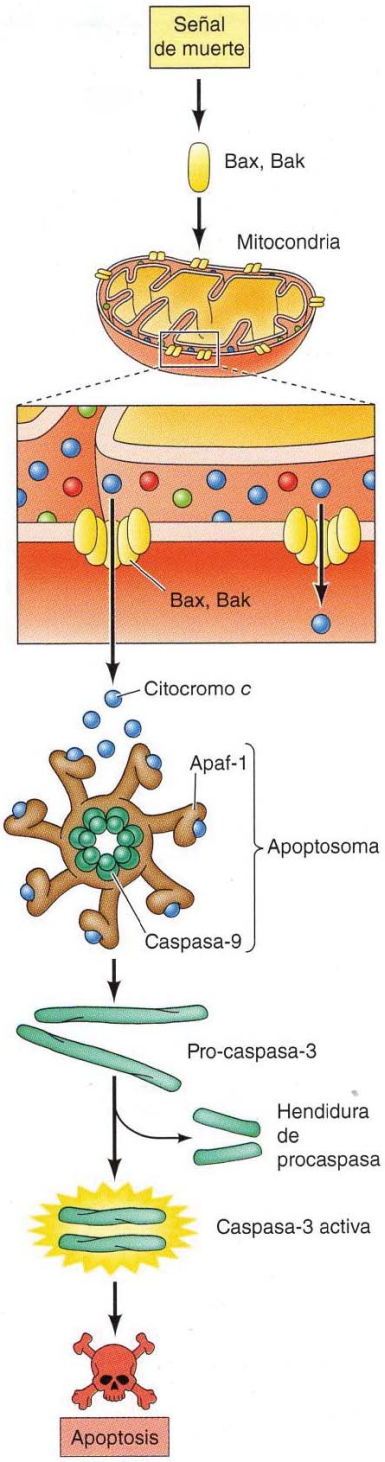


FIGURA 18.6 Interacciones reguladoras entre miembros de la familia Bcl-2. En las células normales, las proteínas proapoptóticas solo-BH3 están inactivas (p. ej., Bid), y las proteínas proapoptóticas multidominio están inhibidas mediante su interacción con las proteínas antiapoptóticas (p. ej., Bcl-2). Las señales de muerte celular activan a las proteínas solo-BH3, que a continuación interaccionan con las proteínas antiapoptóticas, que a continuación antagonizan las proteínas antiapoptóticas y activan Bax y Bak directamente, para producir la muerte celular.

FIGURA 18.7 La vía mitocondrial de la apoptosis. En las células de mamífero, muchas señales de muerte celular inducen apoptosis como resultado de lesiones de las mitocondrias. Cuando están activas, las proteínas efectoras proapoptóticas Bax y Bak forman oligómeros en la membrana externa de las mitocondrias, para producir la liberación de citocromo *c* del espacio intermembrana. La liberación del citocromo *c* desencadena la formación de apoptosomas que contienen Apaf-1 y caspasa-9 en los que se activa la caspasa-9. A continuación la caspasa-9 activa a las caspasas corriente abajo, como la caspasa-3, mediante escisión proteolítica.



En las células de mamífero, los miembros de la familia Bcl-2 actúan en las mitocondrias, que juegan un papel central en el control de la muerte celular programada (**Fig. 18.7**). Cuando se activan, Bax y Bak se oligomerizan para formar poros en la membrana externa mitocondrial, provocando la salida de citocromo *c* del espacio intermembrana de la mitocondria. La liberación del citocromo *c* desencadena la activación de las caspasas. En particular, la caspasa iniciadora clave en las células de mamífero (caspasa-9) es activada mediante la formación de un complejo con Apaf-1 llamado **apoptosoma**. En mamíferos, la formación de este complejo también requiere al citocromo *c*. Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo *c* se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial (véase Fig. 12.1) mientras que Apaf-1 y la caspasa-9 se encuentran en el citosol, de modo que la caspasa-9 permanece inactiva. La activación de Bax o Bak resulta en la liberación del citocromo *c* al citosol, donde se une a Apaf-1 y desencadena la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9. Una vez activada, la caspasa-9 escinde y activa las caspasas efectoras situadas más adelante en la vía, como la caspasa-3 y la caspasa-7, para provocar en su caso la muerte celular.

Las caspasas también están reguladas por un grupo de proteínas denominadas **IAP**, de *i*nhibidor de *ap*optosis. Miembros de la familia IAP interaccionan directamente con las caspasas y suprimen la apoptosis inhibiendo la actividad de las caspasas o dirigiendo a las caspasas hacia su ubiquitilación y degradación por el proteasoma. Los IAP están presentes tanto en *Drosophila* como en mamíferos (pero no en *C. elegans*), y la regulación de su actividad o expresión proporciona otro mecanismo de control de la apoptosis. La regulación de los IAP reviste una especial importancia en *Drosophila*, en la que las caspasas iniciadoras presentan una activación constitutiva y están sometidas a regulación por los IAP (**Fig. 18.8**). Una parte importante de las señales inductoras de la apoptosis en *Drosophila* actúan a través de la activación de proteínas que inhiben a los IAP, lo que da lugar a la activación de caspasas. En las células de mamífero, la permeabilización de las mitocondrias por Bax o Bak no solamente provoca la liberación del citocromo *c*, sino también de inhibidores de los IAP que estimulan la actividad de las caspasas.

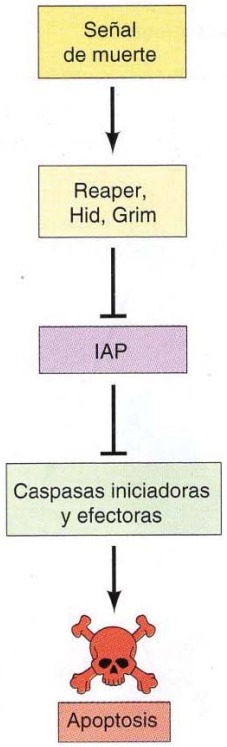


FIGURA 18.8 Regulación de las caspasas por los IAP en *Drosophila*. Muchas señales que inducen la apoptosis en *Drosophila* actúan a través de la activación de miembros de una familia de proteínas (Reaper, Hid y Grim) que inhiben a los IAP y conducen a la activación de las caspasas. Los IAP inhiben tanto a las caspasas iniciadoras como a las efectoras.

◆ Las IAP fueron descubiertas en primer lugar en células de insecto infectadas por virus como proteínas víricas que inhibían la apoptosis de una célula hospedadora.

ANIMACIÓN 18.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a18.2

Vía mitocondrial de la apoptosis. Muchos tipos de estrés celular activan la vía intrínseca de la apoptosis, una vía que provoca la liberación del citocromo *c* por las mitocondrias, la activación de la caspasa-9 y, consecuentemente, la muerte de la célula.

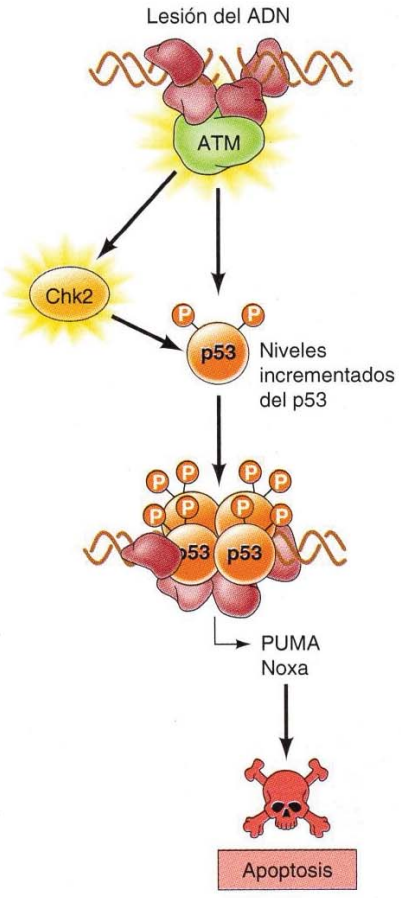


FIGURA 18.9 Papel de p53 en la apoptosis inducida por lesión del ADN. La lesión del ADN desencadena la activación de las proteínas quinasas ATM y Chk2 proteínas quinasas, que fosforilan y estabilizan a p53, lo que resulta en un incremento rápido de los niveles de p53. A continuación, la proteína p53 activa la transcripción de genes que codifican las proteínas proapoptóticas solo-BH3 PUMA y Noxa, dando lugar a la muerte celular.

Vías de señalización que regulan la apoptosis

La actividad integrada de diversas vías de señalización, algunas de las cuales inducen la muerte celular y otras lo hacen para favorecer la supervivencia celular, regulan la muerte celular programada. Estas señales controlan el destino de las células individuales, de modo que la supervivencia celular o la eliminación se ven determinadas por las necesidades del organismo completo. Las vías que inducen la apoptosis en las células de mamífero se clasifican como *intrínsecas* o *extrínsecas* en función de la implicación de las proteínas de la familia Bcl-2 y la identidad de la caspasa que ponga en marcha la muerte celular. La vía intrínseca se activa por las lesiones del ADN y otras formas de estrés celular, mientras que la vía extrínseca es activada por señales procedentes de otras células.

Un papel importante de la apoptosis es la eliminación de células dañadas, de modo que diversos tipos de estrés celular, como daños al ADN, infecciones virales y agotamiento de factores de crecimiento, inducen la apoptosis. Estos estímulos activan la vía intrínseca de la apoptosis, lo que induce la liberación del citocromo *c* por las mitocondrias y la activación de la caspasa-9 (véase Fig. 18.7). Como se muestra en los ejemplos que aparecen a continuación, las diversas señales que activan esta vía convergen en la regulación de los miembros BH3 de la familia Bcl-2.

El ADN dañado representa una de las formas más peligrosas de estrés celular, ya que las células con genomas dañados pueden portar mutaciones que pueden desencadenar el desarrollo de un cáncer. Por tanto, los daños al ADN son uno de los principales desencadenantes de la muerte celular programada, que da lugar a la destrucción de células portadoras de mutaciones potencialmente nocivas. Como se comenta en el Capítulo 17, varios puntos de control del ciclo celular detienen la progresión del ciclo celular como respuesta al ADN dañado, lo que hace posible la reparación de estas lesiones. En las células de mamífero, una de las vías principales que desencadenan la detención del ciclo celular como respuesta a los daños al ADN depende del factor de transcripción **p53**. Las proteína quinasas ATM y Chk2, activadas por daños al ADN, fosforilan y estabilizan a p53, cuyas concentraciones aumentan e inducen la activación transcripcional de los genes diana de esta proteína, como el inhibidor de Cdk p21, el cual inhibe los complejos Cdk2/ciclina E para detener el ciclo celular en la fase G_1 (véase Fig. 17.20). No obstante, la activación de p53 por el ADN dañado también induce la apoptosis (**Fig. 18.9**). La inducción de la apoptosis por p53 se debe, al menos en parte, a la activación transcripcional de genes que codifican a los miembros PUMA y Noxa de la familia Bcl-2 proapotótica. El aumento de la expresión de estas proteínas solo-BH3 conduce a la activación de Bax y Bak, la liberación del citocromo *c* por las mitocondrias, y la activación de la caspasa-9. Por tanto, p53 interviene tanto en la parada del ciclo celular como en la apoptosis como respuesta a daños en el ADN. Si el ADN lesionado en una célula determinada da lugar a la apoptosis o a una detención reversible del ciclo celular puede depender del grado de la lesión y el nivel de inducción resultante de p53, además de la influencia de otras señales de vida/muerte que reciba la célula.

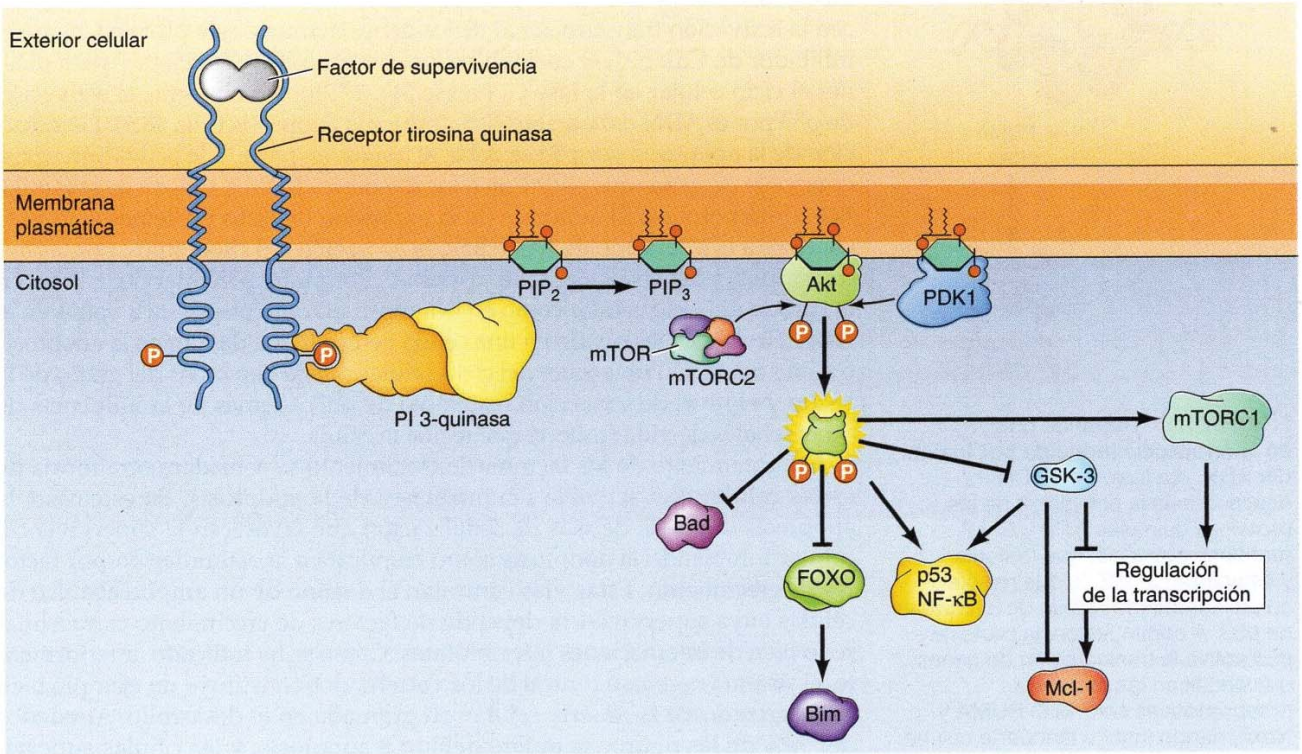
El agotamiento de los factores de crecimiento se considera otra forma de estrés celular que activa la vía intrínseca de la apoptosis. En este caso, la apoptosis depende de vías de señalización que favorecen la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis como respuesta a la estimulación por factores de crecimiento. Estas vías controlan el destino de un amplio abanico de células cuya supervivencia depende de factores de crecimiento extracelulares o bien de interacciones intercelulares. Como se ha indicado anteriormente, el sistema nervioso central de los vertebrados constituye un ejemplo bien caracterizado de la muerte celular programada en el desarrollo. Alrededor del 50% de las neuronas muere debido a apoptosis, y las células supervi-

vientes han recibido cantidades suficientes de señales de supervivencia de sus células diana. Estas señales son factores de crecimiento polipeptídicos relacionados con el factor de crecimiento nervioso (NGF), el cual induce tanto la supervivencia como la diferenciación de las neuronas a través de la activación de una tirosina quinasa de receptores. Otros tipos celulares también dependen de factores de crecimiento o contactos intercelulares que activan a tirosina quinasas no de receptores asociadas a las integrinas. En efecto, la mayoría de las células de los animales superiores están programadas para sufrir apoptosis a no ser que se inhiba de manera activa la muerte celular por señales de supervivencia procedentes de otras células.

Una de las principales vías de señalización responsable de estimular la muerte celular es iniciado por la enzima **PI 3-quinasa**, que es activada por tirosina quinasas o receptores acoplados a proteínas G. La PI 3-quinasa fosforila al fosfolípido de membrana PIP_2 para formar PIP_3, que activa la serina/treonina quinasa **Akt** (véase Fig. 16.32). A continuación, Akt fosforila a un número de proteínas que regulan la apoptosis (**Fig. 18.10**). Un sustrato clave de Akt es el miembro de la familia Bcl-2 proapoptótico solo-BH3, denominado Bad. La fosforilación de Bad por Akt crea un sitio de unión para las proteínas chaperonas 14-3-3 que secuestran a Bad en una forma inactiva, de modo que la fosforilación de Bad por Akt inhibe la apoptosis y favorece la supervivencia celular. Bad es fosforilado de forma similar por proteínas quinasas de otras vías de señalización activadas por factores de crecimiento, incluyendo la vía Ras/Raf/MEK/ERK, de forma que sirve como regulador convergente de la señalización desde factores de crecimiento en la mediación de la supervivencia celular.

Otras dianas de Akt, incluidos los factores de transcripción FOXO, también juegan papeles clave en la supervivencia celular. La fosforilación de FOXO por Akt crea un sitio de unión para proteínas 14-3-3, que secuestran a FOXO en una conformación inactiva en el citoplasma (véase Fig. 16.33). En ausencia de la señalización por factores de crecimiento y de la actividad Akt,

FIGURA 18.10 La vía de la PI 3-quinasa y la supervivencia celular. Muchos factores de crecimiento que señalizan la supervivencia celular activan receptores de tipo tirosina quinasa, dando lugar a la activación de la PI 3-quinasa, formación de PIP_3, y activación de la proteína quinasa, Akt. A continuación, Akt fosforila un cierto número de proteínas que contribuyen a la supervivencia celular. La fosforilación de la proteína solo-BH3 Bad la mantiene en un estado inactivo, al igual que la fosforilación del factor de transcripción FOXO. En ausencia de señalización por parte de Akt, Bad promueve la apoptosis y FOXO estimula la transcripción de Bim, otra proteína solo-BH3 proapoptótica. Otros objetivos de la Akt son la proteína-cinasa GSK-3 proapoptótica y más factores de transcripción, como p53 y NF-κB. La fosforilación por GSK-3 también marca a la proteína antiapoptótica Mcl-1 para ser degradada, y la regulación de la traducción que efectúan GSK-3 y mTOR (véase Fig. 16.34) afecta a la supervivencia celular.



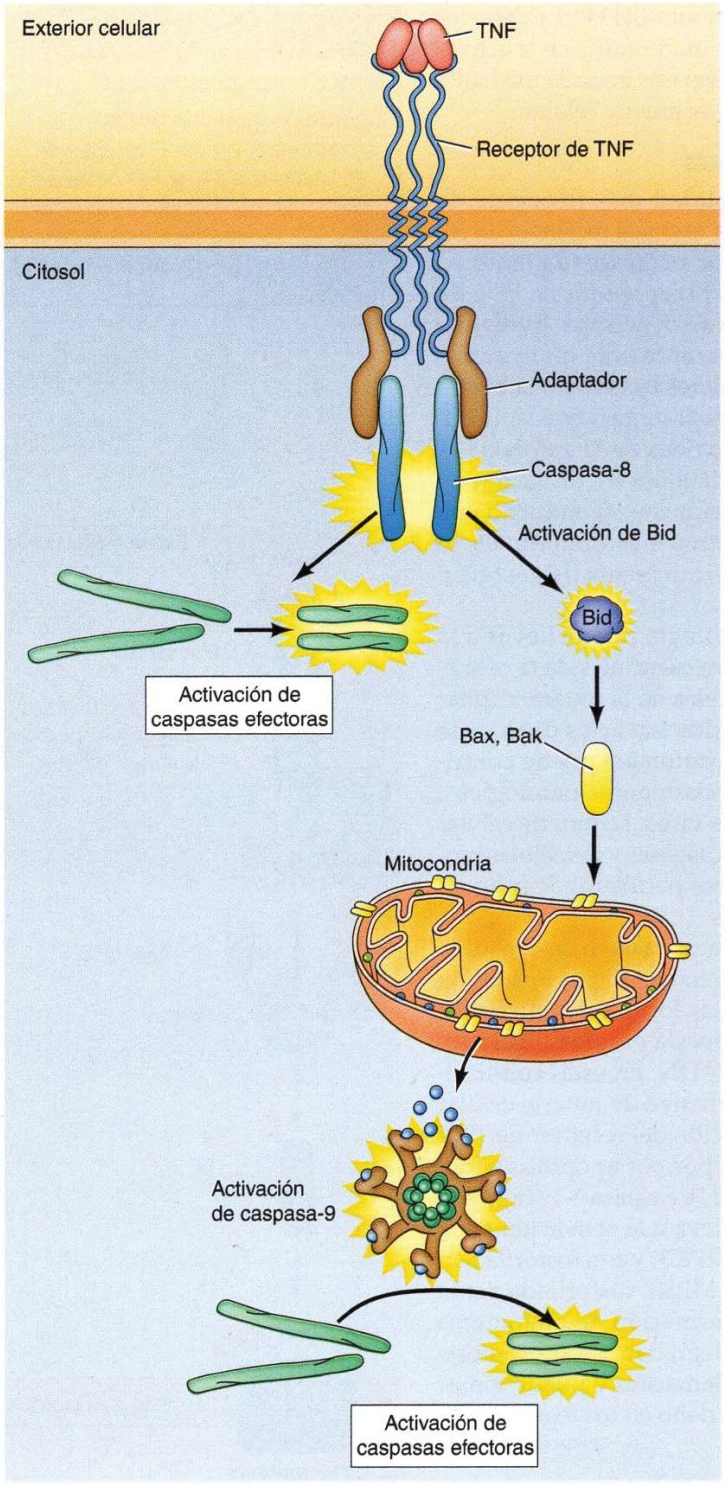


FIGURA 18.11 Receptores de muerte celular. El TNF y otros ligandos de receptores de muerte celular consisten en tres cadenas polipeptídicas, de forma que su unión a los receptores de muerte celular induce la trimerización del receptor. La caspasa-8 es reclutada al receptor y es activada mediante su interacción con moléculas adaptadoras (la vía extrínseca de la apoptosis). Una vez activada, la caspasa-8 puede escindir y activar directamente a las caspasas efectoras. Además, la caspasa-8 escinde la proteína Bid (solo-BH3), que activa la vía mitocondrial de la apoptosis, dando lugar a la activación de la caspasa-9 (véase Fig. 18.7).

FOXO es liberado de 14-3-3 y se transloca al núcleo, estimulando la transcripción de genes proapoptóticos, incluyendo el gen que codifica la proteína solo-BH3, Bim. Akt y su diana corriente abajo GSK-3 también regulan otros factores de transcripción con papeles en la supervivencia celular, incluyendo p53 y NF-κB, que pueden controlar la expresión de otros miembros de la familia Bcl-2. Asimismo, Mel-1, miembro de la familia Bcl-2 antiapoptótico, queda marcado para ser ubicuitilado y degradado por GSK-3, y su concentración también está modulada por la regulación de la traducción que ejercen las vías de GSK-3 y mTOR (véase Fig. 16.34). En la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis confluyen estos efectos múltiples en varios miembros de la familia Bcl-2, que controlan la activación de la caspasa-9 y la supervivencia celular como respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

A diferencia de las vías de señalización del estrés celular y las mediadas por factores de crecimiento que controlan la vía intrínseca de la apoptosis, algunos polipéptidos secretados activan a receptores que inducen la muerte celular a través de la vía extrínseca de la apoptosis. Estos receptores activan directamente una caspasa iniciadora, la caspasa-8 (**Fig. 18.11**). Los polipéptidos que actúan para señalizar la muerte celular en esta vía pertenecen a la familia del **factor de necrosis tumoral (FNT)**. Se unen a miembros de la familia de receptores TNF, que pueden señalizar la apoptosis en una diversidad de tipos celulares. Uno de los miembros mejor caracterizados de esta familia es el receptor de superficie Fas, que juega papeles importantes en el control de la muerte celular en el sistema inmune. Por ejemplo, la apoptosis inducida por activación de Fas es responsable de la muerte de células diana del sistema inmune, como las células cancerosas o infectadas por virus, además de la eliminación del exceso de linfocitos al final de una respuesta inmune.

El TNF y los miembros de la familia relacionados consisten en tres cadenas polipeptídicas idénticas, y su unión induce la trimerización del receptor. Las porciones citoplásmicas de los receptores se unen a moléculas adaptadoras que a su vez se unen a una caspasa iniciadora denominada caspasa-8. Esto desencadena la activación de la caspasa-8, que a su vez escinde y activa a caspasas efectoras corriente abajo. En algunas células, la activación de la caspasa-8 y la consiguiente activación de las caspasas-3 y -7 es suficiente para inducir directamente la apoptosis. En otras células, sin embargo, es necesaria la amplificación de la señal. Esto resulta de la escisión

por parte de la caspasa-8 de la proteína proapoptótica solo-BH3 Bid, dando lugar a la activación de Bid, la permeabilización de las mitocondrias y la activación de la caspasa-9, amplificando así la cascada de caspasas iniciada mediante la activación directa de la caspasa-8 en los receptores de muerte celular.

Vías alternativas de muerte celular programada

A pesar de que la apoptosis representa la modalidad más frecuente de muerte celular regulada o programada, en algunos trabajos recientes de investigación se ha observado que la muerte celular programada también puede darse a través de mecanismos alternativos no apoptóticos. Una de estas vías alternativas de muerte celular regulada se denomina **autofagia**. Como se ha señalado en el Capítulo 9, la autofagia representa un mecanismo de recambio gradual de los componentes celulares basado en la captación de proteínas u orgánulos por vesículas (autofagosomas) que se fusionan con los lisosomas (véase Fig. 9.48). Uno de los fines de la autofagia es promover la supervivencia de las células en condiciones de privación de nutrientes. La activación de la autofagia en estas condiciones conduce a una mayor degradación de las proteínas celulares y otras macromoléculas, lo que permite la degradación de sus componentes como fuente de energía o su reutilización para funciones esenciales.

Sin embargo, en algunas circunstancias la autofagia puede llevar a la muerte celular por degradación de los componentes esenciales de la célula. Tanto la autofagia como la apoptosis son responsables de la muerte celular programada que lleva a la eliminación de los tejidos larvarios durante la metamorfosis en *Drosophila*. En los mamíferos, la autofagia puede contribuir a la muerte celular inducida por diversos tratamientos patológicos, como las farmacoterapias o la infección con algunos virus. La muerte celular por autofagia no depende de la participación de las caspasas y las células moribundas, en lugar de mostrar los rasgos morfológicos peculiares de la apoptosis, se distinguen por la acumulación de lisosomas.

La muerte por necrosis también puede ser programada en mayor medida que un sencillo proceso de lisis celular incontrolada inducido por una lesión aguda. A diferencia de la necrosis incontrolada, estas formas de muerte celular necrótica regulada (**necroptosis**) son una respuesta programada inducida por estímulos como una infección o daños al ADN. En estas condiciones, la necroptosis actúa como un mecanismo alternativo de muerte celular en ausencia de apoptosis. Por ejemplo, la estimulación del receptor de TNF conduce a la muerte celular por necrosis así como por por apoptosis. Además de estimular la apoptosis por la activación de la caspasa-8 (véase Fig. 18.11), la estimulación del receptor TNF también lleva a la activación de la proteína quinasa-3 de interacción con el receptor (RIPK3) y a la fosforilación de su proteína de sustrato MLKL (**Fig. 18.12**). La MLKL fosforilada actúa como un ejecutor de la necroptosis mediante la formación de oligómeros que se asocian con la membrana plasmática y la degradan. La necroptosis parece desempeñar un papel importante en la inflamación y puede tomar parte en diversas enfermedades con inflamación y daño en los tejidos.

VÍDEO 18.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v18.2

Apoptosis inducida por la activación Fas. El receptor de superficie celular Fas desempeña funciones importantes en el control de la muerte celular en el sistema inmune.

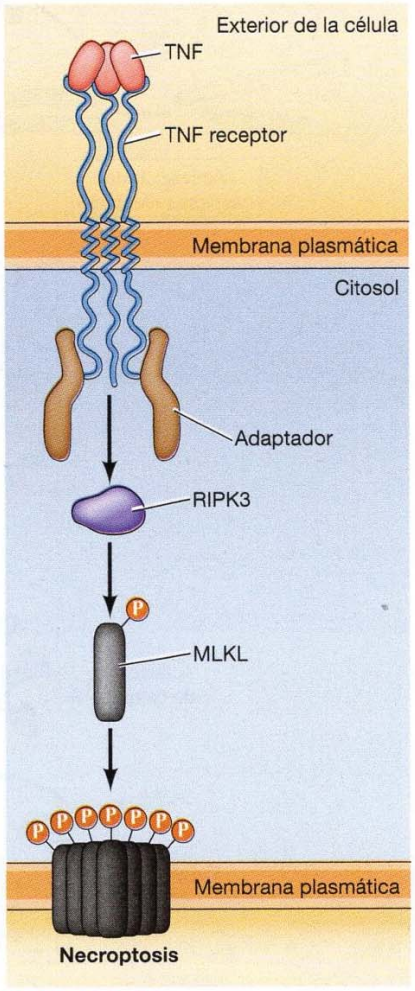


FIGURA 18.12 Necroptosis. La activación del receptor TNF conduce a la estimulación de la proteína quinasa-3 de interacción con el receptor (RIPK3) y a la fosforilación de MLKL. La MLKL fosforilada forma oligómeros que degradan la membrana plasmática y provoca la muerte celular por necroptosis.

Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos

El desarrollo temprano se caracteriza por la rápida proliferación de las células embrionarias, que después se diferencian para formar las células especializadas de los tejidos y órganos adultos. A medida que las células se diferencian, su tasa de proliferación generalmente disminuye, y la mayoría de las células en los animales adultos se encuentran detenidas en la fase G_0 del ciclo celular. Sin embargo, las células se pierden a lo largo de la vida debido a lesiones o a la muerte celular programada. Para mantener un número cons-

tante de células en los tejidos y órganos adultos, la muerte celular debe estar equilibrada con la proliferación celular. Para mantener este equilibrio, la mayoría de los tejidos contienen células que son capaces de proliferar a medida que sea necesario para reemplazar a las células que han muerto. Además, en algunos tejidos una subpoblación celular se divide continuamente a lo largo de la vida para reemplazar las células que poseen una elevada tasa de renovación en los animales adultos. La muerte celular y la renovación celular están, por tanto, cuidadosamente equilibradas para mantener los tejidos y órganos adultos funcionales y con su tamaño apropiado.

Proliferación de células diferenciadas

La mayoría de los tipos de células diferenciadas en los animales adultos no son capaces de proliferar. Si estas células se pierden, son reemplazadas por la proliferación de células menos diferenciadas derivadas de las células madre autorrenovables, como se describe en la siguiente sección. Otros tipos de células diferenciadas, sin embargo, mantienen la capacidad de proliferar a medida que es necesario reparar el tejido dañado a lo largo de la vida del organismo. Estas células entran en la fase G_0 del ciclo celular pero reanudan la proliferación cuando es necesario para sustituir células dañadas o muertas.

Las células de este tipo incluyen a los fibroblastos, que están dispersos en los tejidos conectivos donde secretan colágeno (**Fig. 18.13**). Los fibroblastos de la piel normalmente se encuentran detenidos en la fase G_0 pero rápidamente proliferan, si es necesario, para reparar lesiones resultantes de un corte o una herida. La coagulación sanguínea en el lugar de una lesión da lugar a la liberación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) por parte de las plaquetas sanguíneas. Como se describió en el Capítulo 16, el PDGF activa a un receptor tirosina quinasa, estimulando tanto la proliferación de fibroblastos y su migración hacia el interior de la herida donde su proliferación y secreción de colágeno contribuye a la reparación y cicatrización del tejido dañado.

Las células endoteliales que revisten el interior de los vasos sanguíneos (**Fig. 18.14**) son otro tipo de célula totalmente diferenciada que retiene la capacidad de proliferación. La proliferación de las células endoteliales les permite formar nuevos vasos sanguíneos a medida que son necesarios para la reparación y reformación de tejidos dañados. La proliferación de células endoteliales

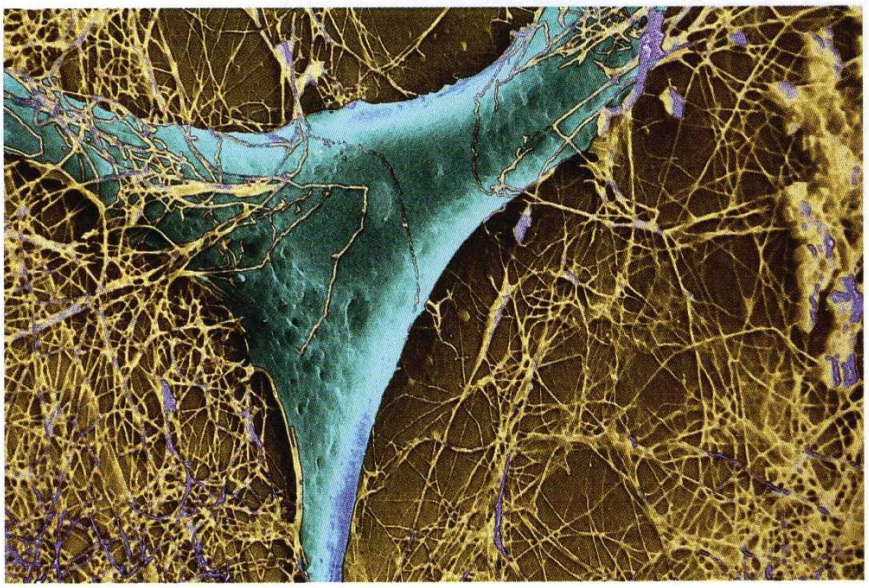


FIGURA 18.13 Fibroblastos de la piel. Micrografía electrónica de barrido de un fibroblasto rodeado de fibrillas de colágeno.

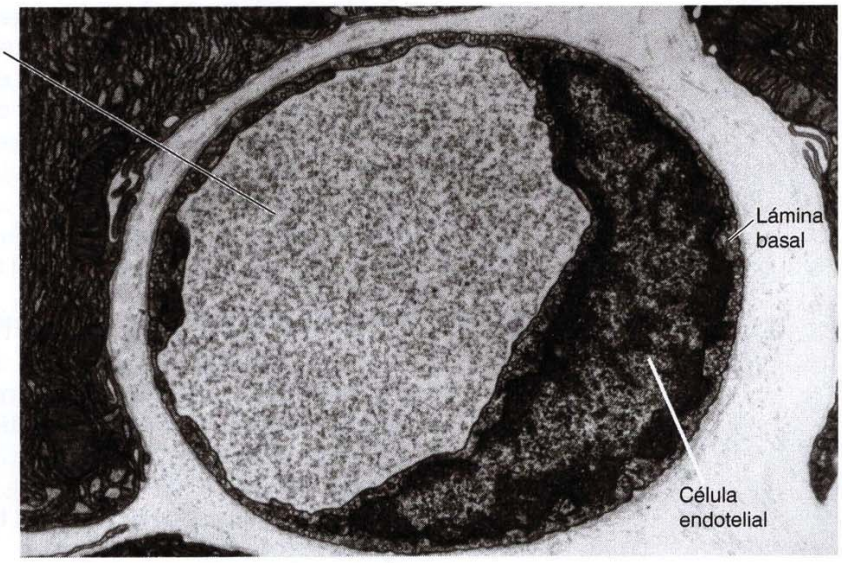


FIGURA 18.14 Células endoteliales. Micrografía electrónica de un capilar. El capilar está revestido por una sola célula endotelial rodeada por una fina lámina basal.

y la formación resultante de los nuevos capilares sanguíneos está desencadenada por un factor de crecimiento (el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF) producido por las células del tejido, que será invadido por los nuevos capilares. La producción de VEGF es, a su vez, desencadenado por la falta de oxígeno, de forma que el resultado es un sistema regulador en el que los tejidos que poseen un suministro de oxígeno bajo como resultado de una circulación insuficiente estimulan la proliferación de las células endoteliales y reclutan nuevos capilares (**Fig. 18.15**). Las células de músculo liso, que forman las paredes de los vasos sanguíneos mayores (p. ej., las arterias) además de las porciones contráctiles de los tractos digestivo y respiratorio y otros órganos internos, también son capaces de reanudar la proliferación en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

Las células epiteliales de algunos órganos internos, también son capaces de proliferar y reemplazar tejido dañado. Un ejemplo llamativo es proporcionado por las células hepáticas, que normalmente se encuentran detenidas en la fase G_0 del ciclo celular. Sin embargo, si se pierden grandes cantidades de células hepáticas (p. ej., mediante resección quirúrgica de parte del hígado), las células restantes son estimuladas para proliferar y reemplazar el tejido que falta (**Fig. 18.16**). Por ejemplo, la resección quirúrgica de dos terceras partes del hígado de una rata es seguido de una rápida proliferación de las células restantes, dando lugar a la regeneración del hígado completo en pocos días.

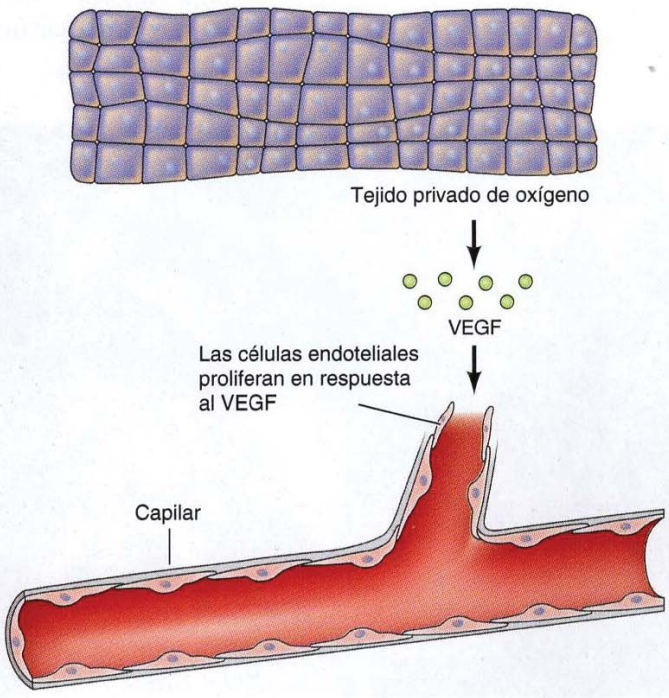


FIGURA 18.15 Proliferación de células endoteliales. Las células endoteliales son estimuladas para proliferar por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF es secretado por células privadas de oxígeno, dando lugar al crecimiento de nuevos capilares hacia tejidos que carecen de un suministro sanguíneo adecuado.

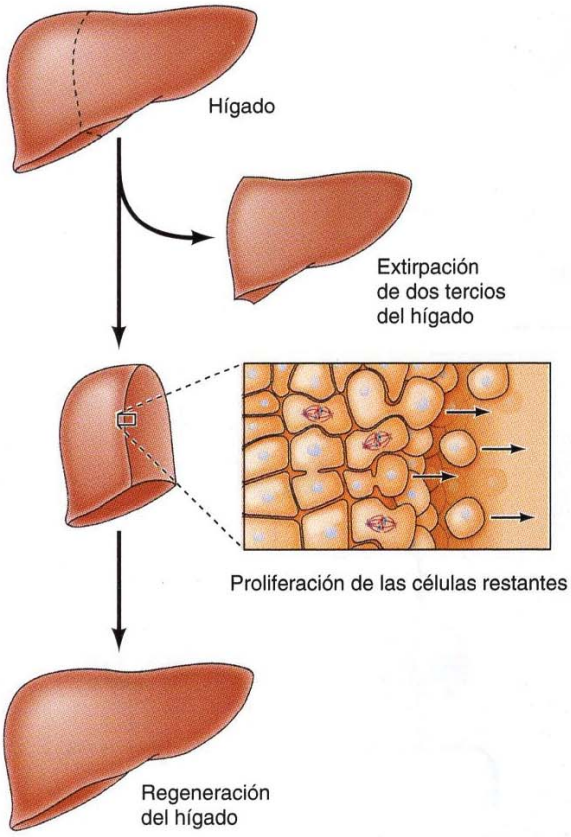


FIGURA 18.16 Regeneración hepática. Las células hepáticas normalmente están detenidas en G_0 pero reanudan la proliferación para reemplazar tejido dañado. Si dos terceras partes del hígado de una rata son extirpadas quirúrgicamente, las células restantes proliferan para regenerar el hígado completo en pocos días.

Células madre

La mayoría de las células completamente diferenciadas en los animales adultos, sin embargo, ya no poseen la capacidad de división celular. No obstante, pueden ser sustituidas por la proliferación de una subpoblación de células autorrenovables menos diferenciadas denominadas **células madre**, que están presentes en la mayoría de los tejidos adultos. Puesto que mantienen su capacidad de proliferar y reemplazar células diferenciadas a lo largo de la vida de un animal, las células madre juegan un papel crítico en el mantenimiento de la mayoría de los tejidos y órganos.

La propiedad clave de las células madre es que se dividen para producir una célula hija, que sigue siendo una célula madre, y otra que se divide y se diferencia (**Fig. 18.17**). Las células madres dan lugar típicamente a células de proliferación rápida (denominadas células amplificadoras del tránsito) que se dividen varias veces antes de diferenciarse, de modo que la división de una célula madre resulta en la génesis de múltiples células diferenciadas. Debido a que la división de las células madre produce nuevas células madre además de células hijas diferenciadas, las células madre son poblaciones autorrenovables que sirven como una fuente para la producción de células diferenciadas a lo largo de la vida. El papel de las células madre es particularmente evidente en el caso de diversos tipos de células diferenciadas, incluyendo las células sanguíneas, espermatozoides, células epiteliales de la piel y las células epiteliales que revisten el tracto digestivo —todas ellas con una corta vida media que deben ser sustituidas por la proliferación celular continua en los animales adultos—. En todos estos casos, las células completamente diferenciadas no proliferan; por el contrario, son continuamente renovadas mediante la proliferación de células madre que a continuación se diferencian para mantener un número estable de células diferenciadas. Las células madre también se han identificado en una diversi-

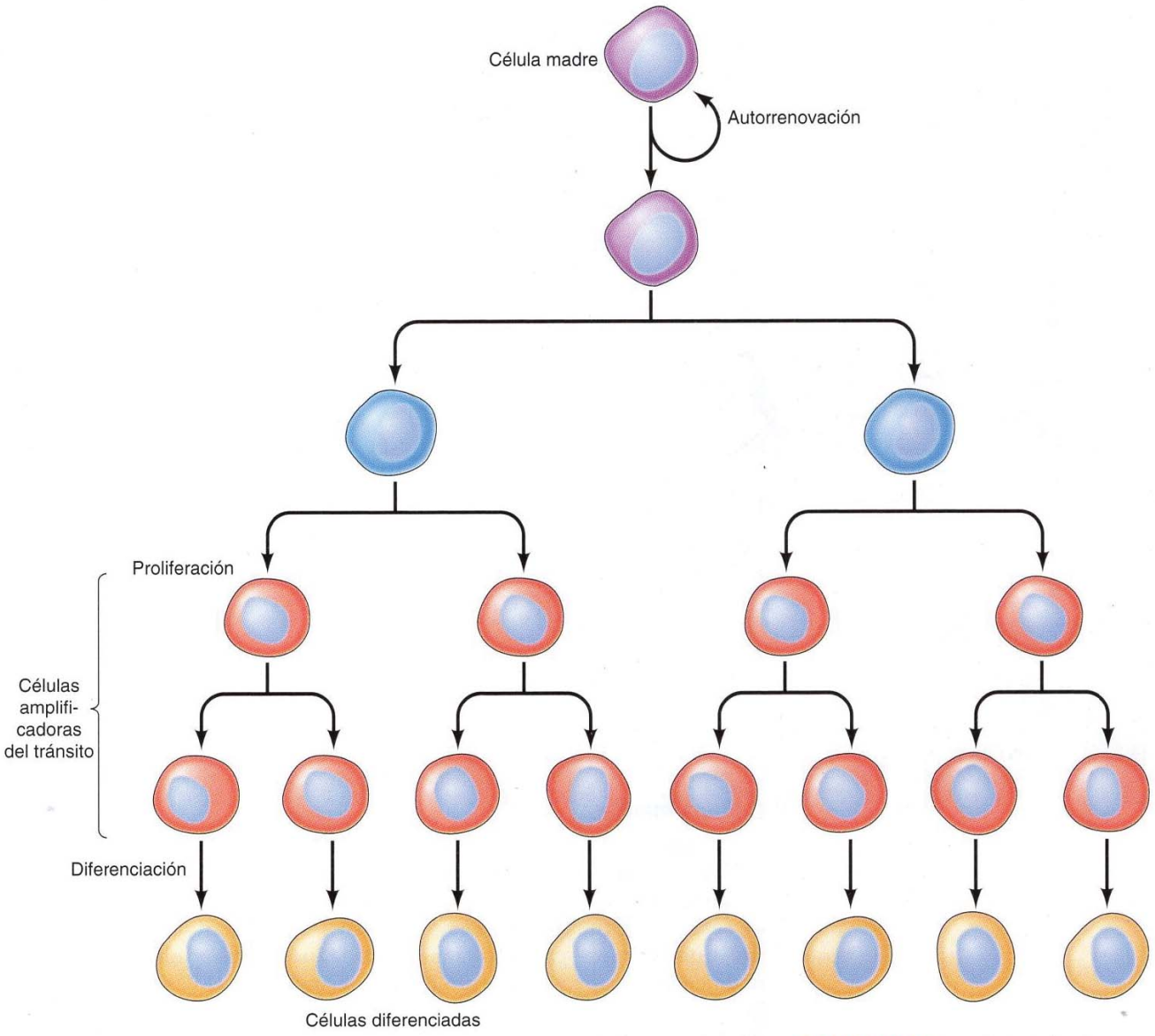


FIGURA 18.17 Proliferación de células madre. Las células madre se dividen para formar una célula hija que sigue siendo una célula madre y una segunda de la que se derivan células amplificadoras del tránsito; estas últimas pasan por varias divisiones celulares antes de diferenciarse.

dad de tejidos adultos, incluyendo el músculo esquelético y el sistema nervioso, donde pueden funcionar para sustituir tejido dañado.

Las células madre fueron identificadas por primera vez en el sistema hematopoyético (formador de la sangre) por Ernest McCulloch y James Till en 1961 en experimentos donde se mostraba que células aisladas derivadas de la médula ósea de ratón, podían proliferar y generar múltiples tipos diferenciados de células sanguíneas. Las células madre hematopoyéticas están bien caracterizadas y la producción de células sanguíneas constituye un buen ejemplo del papel de las células madre en el mantenimiento de las poblaciones celulares diferenciadas. Existen varios tipos diferentes de células sanguíneas con funciones especializadas: los eritrocitos (glóbulos rojos), que transportan O_2 y CO_2; los granulocitos y macrófagos, que son células fagocíticas; las plaquetas (que son fragmentos de megacariocitos), que funcionan en la coagulación sanguínea, y linfocitos, que son responsables de la respuesta inmune. Todas estas células han derivado de la misma población de células madre hematopoyéticas. Más de 100 mil millones de células sanguíneas se pierden diariamente en el ser humano, y deben ser continuamente producidas a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea (**Fig. 18.18**). Los descendientes de las células madre hematopoyéticas continúan proliferando y sufren varios ciclos de división a medida que se

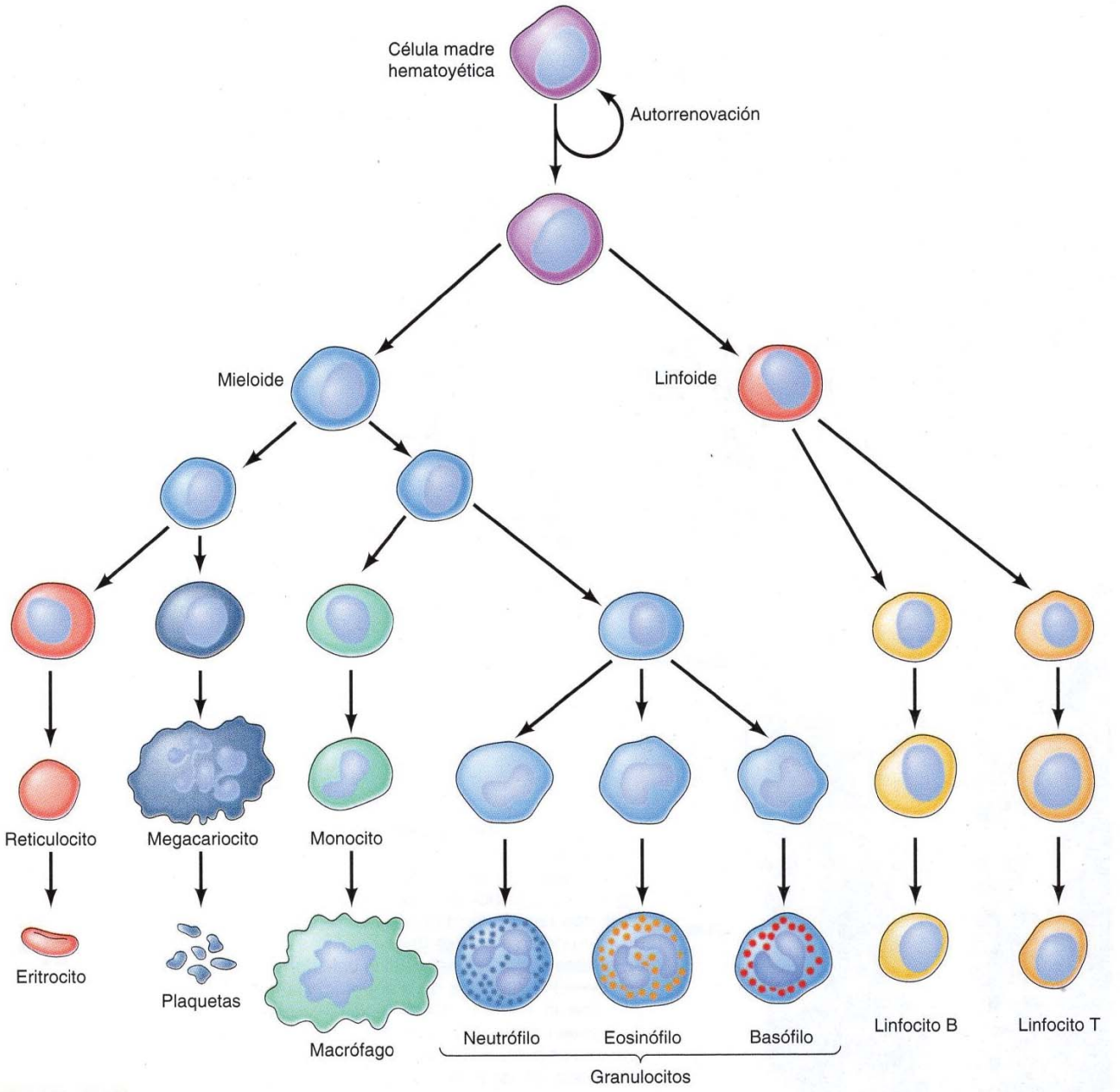


FIGURA 18.18 Formación de células sanguíneas. Todos los diferentes tipos de células sanguíneas se desarrollan a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea. Los precursores de las células diferenciadas sufren varios ciclos de división (no mostrado) antes de diferenciarse.

comprometen a las vías de diferenciación específicas, así determinadas por los factores de crecimiento que dirigen la diferenciación celular. Una vez que se han diferenciado por completo, las células sanguíneas cesan su proliferación, de modo que el mantenimiento de las poblaciones de células sanguíneas diferenciadas depende de la división continua de la célula madre hematopoyética autorrenovable.

El intestino constituye un ejemplo excelente de células madre en la autorrenovación de un tejido epitelial. El intestino se encuentra revestido por una sola capa de células epiteliales que son responsables de la digestión del alimento y la absorción de nutrientes. Estas células epiteliales intestinales están expuestas a un ambiente extremadamente duro y poseen una vida media de tan solo unos días antes de su muerte por apoptosis y su desprendimiento al tracto digestivo. La renovación del epitelio intestinal es, por tanto, un proceso continuo a lo largo de la vida. Las células nuevas se derivan de la división lenta pero continua de células madre que se encuentran al fondo de las criptas intestinales (**Fig. 18.19**). Las células madre dan lugar a una población de células amplificadoras de tránsito, que se dividen rápidamente y ocupan

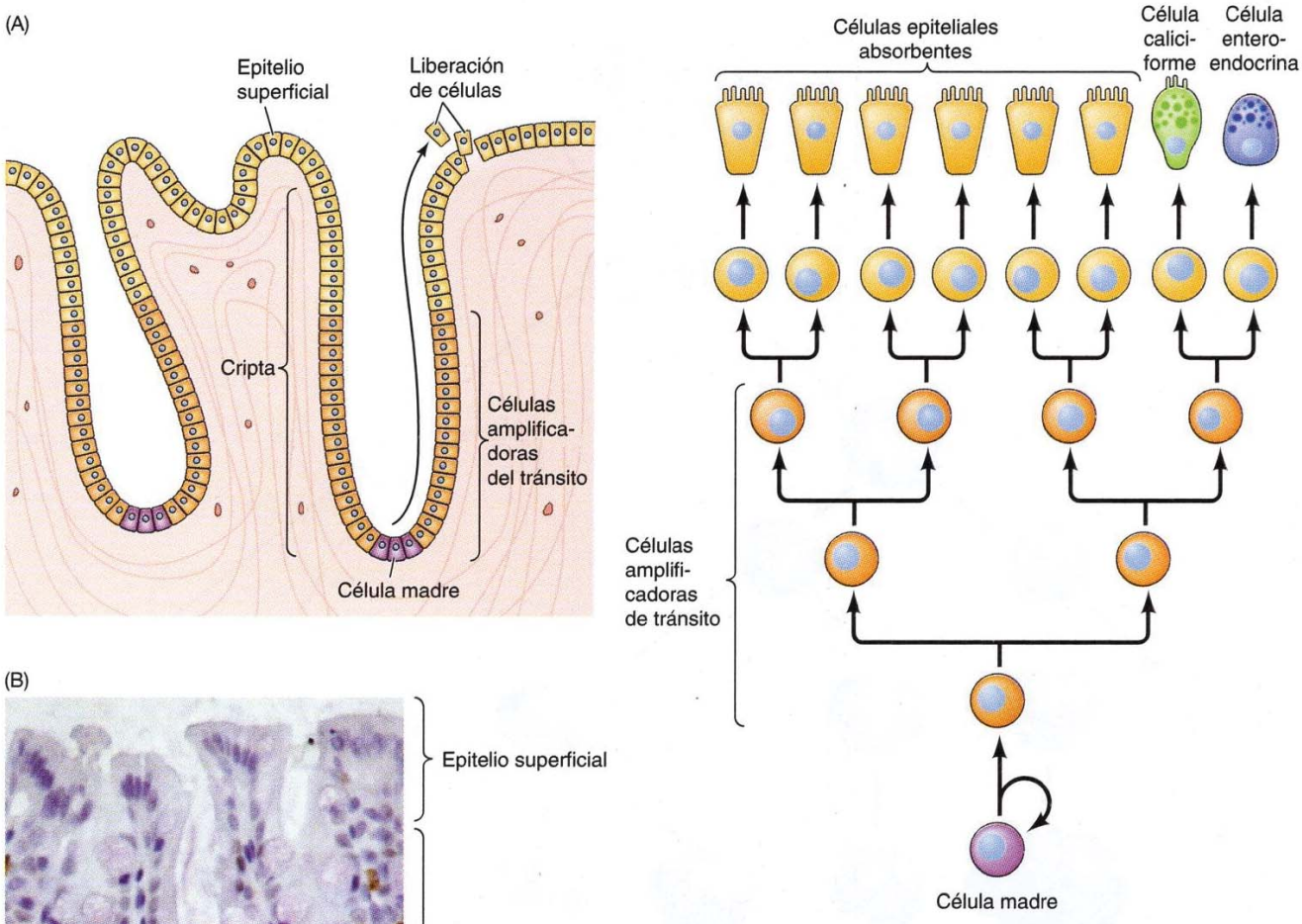


FIGURA 18.19 Renovación del epitelio intestinal. (A) Las células epiteliales del colon son renovadas mediante la división de una célula madre localizada en el fondo de la cripta intestinal. La célula madre da lugar a una población de células amplificadoras de tránsito, que ocupan unos dos tercios de la cripta y sufren tres a cuatro divisiones antes de diferenciarse en tres tipos celulares de la superficie epitelial (células epiteliales absorbentes, células caliciformes y células enteroendocrinas). Las células epiteliales de la superficie sufren apoptosis continuamente y se liberan al lumen intestinal. (B) Micrografía de una cripta colónica y del epitelio superficial. Las células proliferantes están marcadas con un anticuerpo frente a una proteína del ciclo celular (núcleos marrones). (B, de F. Radtke y H. Clevers, 2005. *Science* 307: 1904.)

aproximadamente dos tercios de la cripta. Las células amplificadoras de tránsito proliferan durante tres a cuatro divisiones celulares y a continuación se diferencian en tres tipos celulares en la superficie del epitelio del colon: células epiteliales de absorción, y dos tipos de células secretoras, denominadas células caliciformes y células enteroendocrinas. El intestino delgado también contiene un cuarto tipo celular, las células de Paneth, que secretan agentes antibacterianos. Cada cripta contiene células madre que se autorrenuevan y pueden dar lugar a todos los tipos celulares del epitelio intestinal.

Las células madre que son responsables de la renovación continua de la piel y el pelo también están bien caracterizadas. Al igual que el revestimiento del intestino, la piel y el pelo están expuestos a condiciones ambientales externas duras —que incluyen las radiaciones ultravioletas de la luz solar— y se renuevan continuamente a lo largo de la vida. La piel se compone de tres linajes celulares principales: la epidermis, los folículos pilosos y las

glándulas sebáceas, que secretan aceites que lubrican la superficie cutánea. Cada una de estas tres poblaciones deriva de unas células madre específicas (**Fig. 18.20**). La epidermis es un epitelio formado por varias capas cuyas células están sometidas a una renovación constante. En humanos, la epidermis regresa a las dos semanas, con células superficiales nuevas. Las células madre epidérmicas, localizadas en la capa basal, sustituyen a estas células. Dichas células madre dan lugar a células de amplificación de tránsito, las cuales sufren entre tres y seis divisiones antes de diferenciarse y migrar hacia la superficie de la piel. Las células madre que generan el cabello se encuentran en una región del folículo piloso conocida como el *bulge*. Las células madre del *bulge* producen células de matriz de amplificación de tránsito, que proliferan y se diferencian para dar lugar a la vaina pilosa. Por último, una tercera población de células madre se sitúa en la base de la glándula sebácea. Cabe destacar que las CESL madre del *bulge* pueden también producir epidermis y glándulas sebáceas cuando la piel sufre algún daño, lo que pone de manifiesto su capacidad totipotencial de generar tanto piel como cabello.

El músculo esquelético proporciona un ejemplo del papel de las células madre en la reparación del tejido dañado, al contrario que la renovación celular continua descrita anteriormente en el sistema hematopoyético, epitelio intestinal y en la piel. El músculo esquelético está compuesto por células grandes multinucleadas (fibras musculares) formadas mediante fusión celular durante el desarrollo (véase Fig. 13.22). Aunque el músculo esquelético normalmente es un tejido estable con poca renovación celular, es capaz de regenerarse rápidamente en respuesta a lesiones o al ejercicio. Esta regeneración está mediada por la proliferación de las células satélite, que son las células madre del músculo adulto. Las células satélite están localizadas bajo la lámina basal de fibras musculares (**Fig. 18.21**). Normalmente están quiescentes, detenidas en la fase G_0 del ciclo celular, pero se activan para proliferar en respuesta a lesiones o ejercicio. Una vez activadas, las células satélite dan lugar a la progenie que sufren varias divisiones y a continuación se diferencian y fusionan para formar nuevas fibras musculares. La capacidad continuada del músculo esquelético de regenerarse a lo lago de la vida se debe a la autorrenovación de la población de células madre satélite.

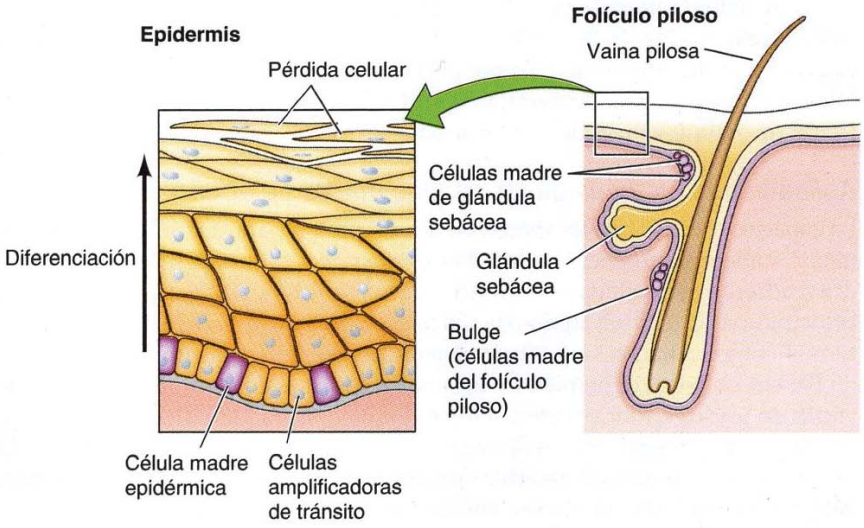


FIGURA 18.20 Células madre de la piel. La epidermis consiste en múltiples capas de células epiteliales. Las células de la superficie se pierden continuamente y son reemplazadas por las células madre epidérmicas de la lámina basal. La célula madre da lugar a células amplificadoras de tránsito, que sufren de 3 a 6 divisiones en la lámina basal antes de diferenciarse y desplazarse hacia la superficie de la piel. Las células madre de la glándula sebácea están en su base, y las células madre de los folículos pilosos se encuentran en una región situada por debajo de la glándula sebácea que se denomina protuberancia.

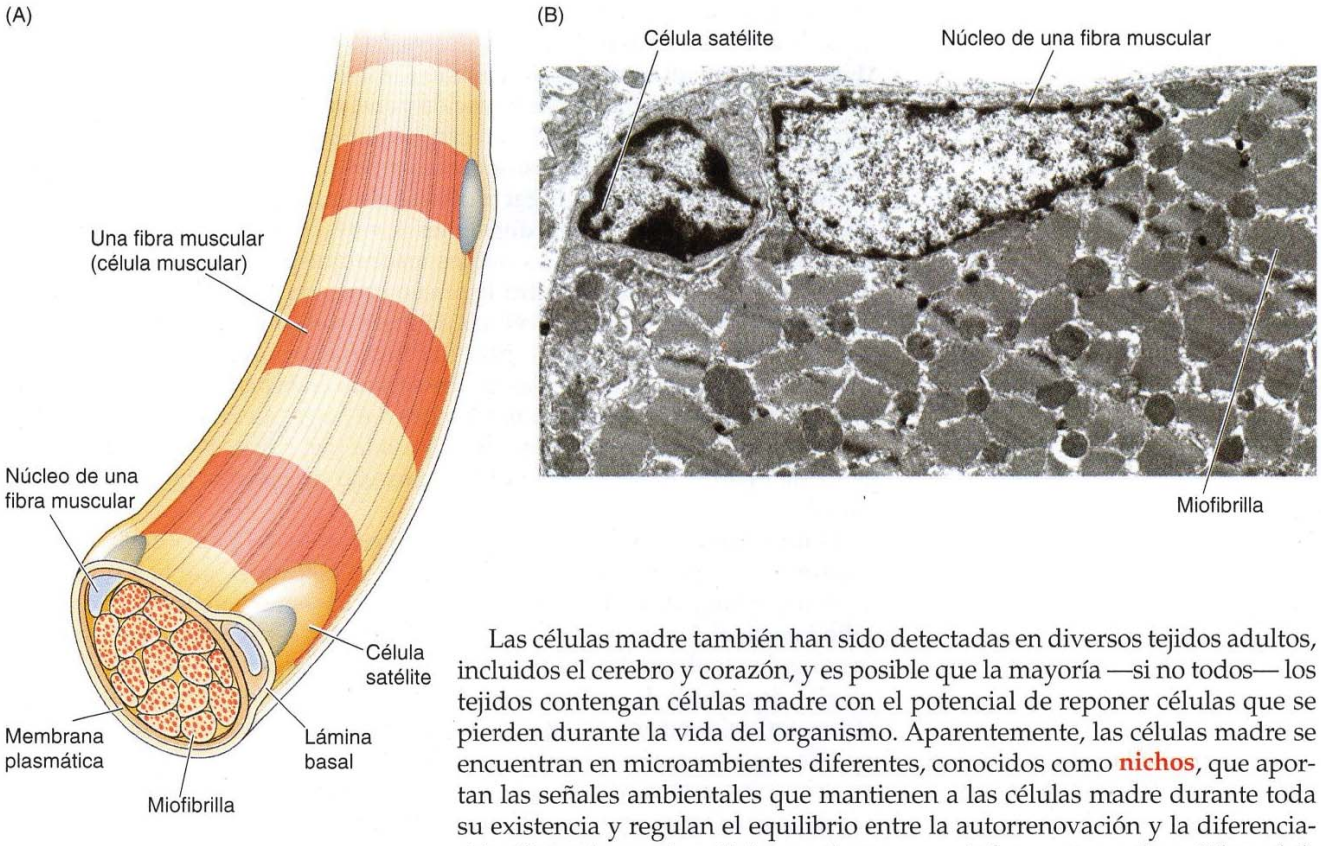


FIGURA 18.21 Células musculares satélite. (A) Las células madre del músculo esquelético son las células satélite, localizadas bajo la lámina basal de las fibras musculares. (B) Micrografía electrónica que muestra una célula satélite y el núcleo de una fibra muscular. (B, de S. Chargé y M. Rudnicki, 2003. *Physiol. Rev.* 84: 209; cortesía de Sophie Chargé y Michael Rudnicki.)

Las células madre también han sido detectadas en diversos tejidos adultos, incluidos el cerebro y corazón, y es posible que la mayoría —si no todos— los tejidos contengan células madre con el potencial de reponer células que se pierden durante la vida del organismo. Aparentemente, las células madre se encuentran en microambientes diferentes, conocidos como **nichos**, que aportan las señales ambientales que mantienen a las células madre durante toda su existencia y regulan el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación. Sin embargo, las células madre son muy infrecuentes en los tejidos adultos, por lo que la identificación exacta de estas células y sus nichos constituye un destacado desafío en el estudio de las células madre. Por ejemplo, a pesar de conocerse desde hace tiempo la función que desempeñan las CESL madre en el mantenimiento del epitelio intestinal, las células madre intestinales localizadas en la base de la cripta (véase Fig. 18.19) se han identificado primero en los estudios de Hans Clever y cols. de 2007. La señalización de la vía de Wnt (véase Fig. 16.42) desempeña un papel destacado en el control de la proliferación de estas células madre, y los polipéptidos secretados por células epiteliales adyacentes y los fibroblastos del tejido conjuntivo subyacente se ocupan de mantener a las células madre intestinales (**Fig. 18.22**). De igual modo, esta vía interviene en la regulación de otros tipos de células madre, como las de la piel y el sistema hematopoyético. Además, las vías de TGF-β, Hedgehog y Notch (véanse Figs. 16.39, 16.41 y 16.43) así como interacciones con la matriz extracellular desempeñan unos papeles destacados en la regulación de las células madre, aunque aún no se han definido sus funciones precisas en la regulación de distintos tipos de células madre.

Aplicaciones médicas de las células madre de adulto

La capacidad de las células madre de adulto para reparar tejido dañado claramente sugiere su potencial utilidad en la medicina clínica. Si estas células madre pudieran ser aisladas y amplificadas en cultivo, podrían emplearse en principio para sustituir tejidos dañados y para tratar una diversidad de trastornos, como la diabetes o trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. En algunos casos, el uso de células madre derivadas de tejidos adultos podría ser el enfoque óptimo para dichas terapias de células madre, aunque el uso de células madre embrionarias (analizados en la siguiente sección de este capítulo) probablemente proporcione una posibilidad más versátil para el tratamiento de una variedad mayor de trastornos.

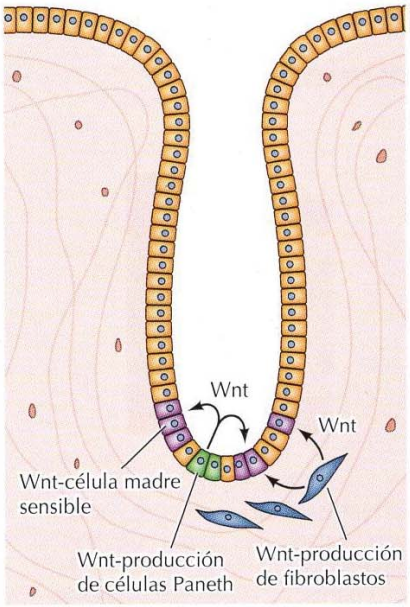


FIGURA 18.22 El nicho de las células madre intestinales. Las células madre del intestino delgado son mantenidas por polipéptidos Wnt secretados por células de Paneth adyacentes y fibroblastos en el tejido conjuntivo subyacente.

◆ La sangre procedente de cordones umbilicales almacenada procedente de un donante no relacionado también puede emplearse como fuente de células madre hematopoyéticas para el trasplante.

Una aplicación clínica bien establecida de las células madre de adulto es el **trasplante de células madre hematopoyéticas** (o **trasplante de médula ósea**), que juega un papel importante en el tratamiento de una diversidad de cánceres. Como se describe en el Capítulo 19, la mayoría de los cánceres son tratados mediante quimioterapia con principios activos que matan células que se dividen rápidamente, dañando su ADN o inhibiendo la replicación del ADN. Estos principios activos no actúan de forma selectiva contra las células cancerosas sino que son también tóxicos para los tejidos normales que dependen de su continua renovación por acción de células madre como la sangre, piel, pelo y el epitelio intestinal. Las células madre hematopoyéticas se encuentran entre las células en división más rápidas del cuerpo, de modo que los efectos tóxicos de los principios activos anticancerosos sobre estas células, frecuentemente limitan la eficacia de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer. El trasplante de células madre hematopoyéticas proporciona una posibilidad de evitar esta toxicidad, permitiendo así el uso de dosis mayores de los principios activos para tratar el cáncer del paciente de forma más efectiva. En este procedimiento, el paciente es tratado con dosis elevadas de quimioterapia que normalmente no serían toleradas debido a sus efectos tóxicos sobre el sistema hematopoyético (**Fig. 18.23**). El daño potencialmente letal es reparado, sin embargo, mediante la transferencia de células madre hematopoyéticas (obtenidas de la médula ósea o de sangre periférica) al paciente después de completar la quimioterapia, de forma que el sistema hematopoyético normal es restaurado. En algunos casos, las células madre se obtienen del paciente antes de la quimioterapia, son almacenadas y devueltas al paciente una vez se completa la quimioterapia. Sin embargo, es importante asegurar que estas células no están contaminadas con células cancerosas. Como alternativa, las células madre a trasplantar pueden obtenerse de un donante sano (generalmente un pariente cercano) cuyo tipo de tejido se parece estrechamente al del paciente. Además de su uso en el tratamiento de cáncer, las transferencias de células madre hematopoyéticas se emplean para tratar pacientes con patologías del sistema hematopoyético, como la anemia aplástica, trastornos de la hemoglobina y deficiencias inmunes.

Las células madre epiteliales también han encontrado una aplicación clínica en forma de trasplantes de piel que se emplean para tratar a pacientes con quemaduras, heridas y úlceras. Una técnica de estos procedimientos consiste en cultivar células de la piel epidérmica para formar una película epitelial, que puede a continuación ser transferida al paciente. Puesto que la propia piel del paciente puede emplearse en este procedimiento, se elimina la complicación potencial de rechazo del trasplante por parte del sistema inmune. Las posibilidades de emplear células madre de adulto para terapias de sustitución similares en otras patologías, incluyendo la diabetes y la enfermedad de Parkinson, y distrofias musculares, también se investigan con gran interés. Sin embargo, estas aplicaciones clínicas de las células madre de adulto están limitadas por las dificultadas relacionadas con el aislamiento y cultivo de las poblaciones de células madre apropiadas.

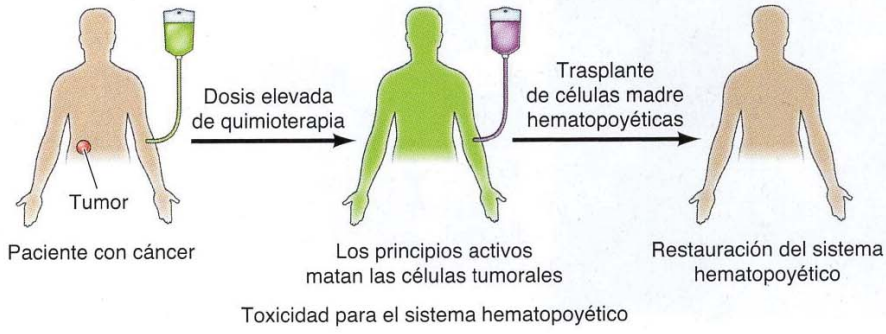
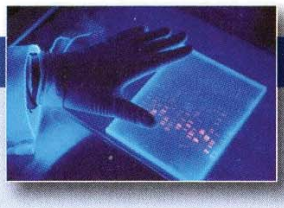


FIGURA 18.23 Trasplante de células madre hematopoyéticas. Un paciente con cáncer es tratado con dosis elevadas de quimioterapia, que mata las células tumorales eficazmente pero normalmente no sería tolerada debido al daño potencialmente letal para el sistema hematopoyético. Este daño es reparado a continuación mediante un trasplante de células madre hematopoyéticas nuevas.



EXPERIMENTO CLAVE

Cultivo de células madre embrionarias

Aislamiento de una línea celular pluripotencial a partir de embriones tempranos de ratón cultivados en medio condicionado de células madre de teratocarcinoma

Gail R. Martin

Universidad de California, San Francisco, CA

Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1981, Volumen 78, págs. 7634-7638

Gail R. Martin

Contexto

Las células de embriones tempranos son únicas en su capacidad de proliferación y diferenciación en todos los tipos de células que componen los tejidos y órganos de los animales adultos. En 1970 se encontró que los embriones tempranos de ratón con frecuencia desarrollaban tumores cuando eran retirados del útero y trasplantados en un sitio anómalo. Estos tumores, denominados teratocarcinomas, contenían células que eran capaces de formar una gama de tejidos diferentes a medida que crecían en el animal. Además, las células procedentes de los teratocarcinomas (denominadas células de carcinoma embrionario) podían aislarse y crecer en cultivo. Estas células se parecían a las células embrionarias normales y podía inducirse su diferenciación en una variedad de tipos celulares en cultivo. Algunas células de carcinoma embrionario también podían participar en el desarrollo normal de un ratón, si eran inyectadas en embriones tempranos de ratón (blastocistos) y a continuación implantados en una madre adoptiva.

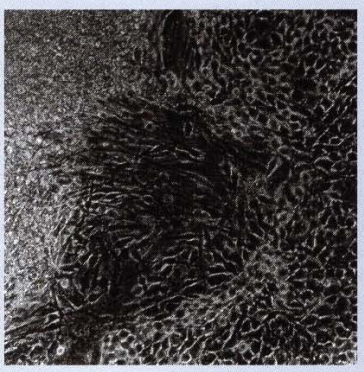
La capacidad de las células de carcinoma embrionario de diferenciarse en una diversidad de tipos celulares y de participar en el desarrollo normal del ratón, sugería que estas células derivadas de tumores podían estar estrechamente emparentadas con las células madre embrionarias normales. Sin embargo, los sucesos que ocurrieron durante el establecimiento de teratocarcinomas en ratón eran desconocidos. Gail Martin hipotetizó que las células de carcinoma embrionario encontradas en los teratocarcinomas eran, esencialmente, células embrionarias normales que proliferaban anómalamente debido, sencillamente, a que cuando eran retiradas del útero y trasplantadas a un sitio extraño, no recibían las señales apropiadas para inducir la diferenciación normal. Basándose en esta hipótesis, intentó cultivar células de embriones de ratón con el objetivo de aislar líneas de células madre embrionarias normales. Sus experimentos, junto con un trabajo similar de Martin Evans y Matthew Kaufman (establecimiento en cultivo de células pluripotenciales a partir de embriones de ratón, *Nature*, 1981, 292: 154-156), demostraron que las células madre pluripotentes podían cultivarse directamente a partir de embriones de ratón normales. El aislamiento de estas líneas de células madre embrionarias permitió la posterior manipulación genética y el análisis del desarrollo del ratón, además de plantear el posible uso de células madre embrionarias humanas en la terapia de trasplante.

Experimentos

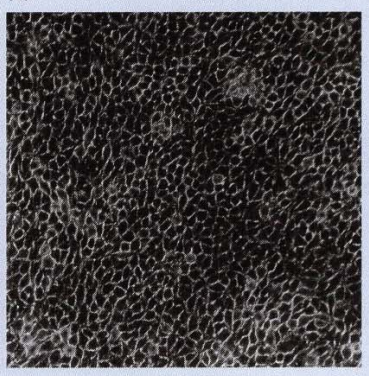
Basándose en la premisa de que las células de carcinoma embrionarias se derivaban a partir de células madre embrionarias normales, Martin intentó cultivar células a partir de blastocistos normales de ratón. Empezando con las células de aproximadamente 30 embriones, aisló inicialmente cuatro colonias de células en crecimiento tras una semana de cultivo. Estas células podían pasarse repetidamente a cultivos en masa, y podían derivarse, de forma

Las células madre embrionarias se diferencian en cultivo para formar una variedad de tipos celulares, incluyendo células semejantes a neuronas (A), células endodérmicas (B), y cartílago (C).

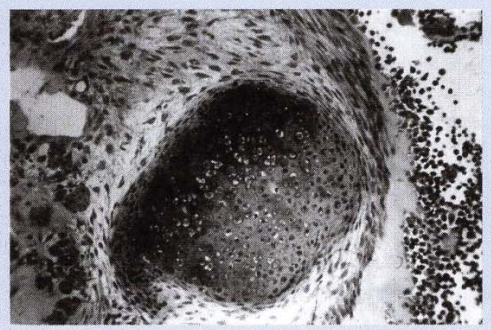
(A)



(B)



(C)



EXPERIMENTO CLAVE

reproducible, en nuevas líneas celulares cuando se repetía el experimento con embriones de ratón adicionales.

Las líneas celulares derivadas a partir de embriones normales (células madre embrionarias) se asemejaban a las células de carcinoma embrionario, derivadas de tumores. Lo más importante es que podía inducirse la diferenciación de las células madre embrionarias en cultivo en una variedad de tipos celulares, incluyendo células endodérmicas, cartílago y células semejantes a neuronas (véase figura). Es más, si las células madre embrionarias eran inyectadas en un ratón, formaban tumores que contenían múltiples tipos celulares diferenciados. Parecía entonces, que las líneas de células madre embrionarias, que retenían la capacidad de diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares, podían establecerse en cultivo a partir de embriones normales de ratón.

Impacto

El establecimiento de líneas de células madre embrionarias ha tenido un gran impacto sobre el estudio de la genética y el desarrollo del ratón, además de abrir nuevas posibilidades para el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas. Experimentos sucesivos demostraron que las células madre embrionarias eran pluripotentes y podían participar en el desarrollo normal del ratón tras su inyección en embriones murinos. Puesto que podían utilizarse técnicas de transferencia génica para introducir o mutar genes en las células madre embrionarias cultivadas, estas células se han utilizado para investigar el papel de diversos genes en el desarrollo del ratón. Como se estudió en el Capítulo 4, cualquier gen de interés puede ser inactivado en las células madre embrionarias, mediante la recombinación homóloga con un ADN clonado, y el papel de dicho gen en el desarrollo del ratón puede determinarse a continuación, introduciendo las células madre embrionarias alteradas en embriones de ratón.

En 1998, dos grupos de investigadores desarrollaron las primeras líneas de células madre embrionarias humanas. Más recientemente, en 2006, se describió la inducción de células madre pluripotentes de fibroblastos adultos. Debido a la capacidad de proliferación y diferenciación de estas células, ofrecen la posibilidad de proporcionar nuevas terapias para el tratamiento de una variedad de enfermedades. A pesar de que el número de problemas técnicos permanecen, deben afrontarse las terapias de trasplante basadas en el empleo de células madre pluripotentes, pueden proporcionar la mayor esperanza para el tratamiento de enfermedades como la de Parkinson, Alzheimer, la diabetes y las lesiones de la médula espinal.

Células madre pluripotenciales, reprogramación celular y medicina regenerativa

Mientas que las células madre de adultos son difíciles de aislar y cultivar, resulta relativamente sencillo aislar y amplificar las células madre procedentes de embriones tempranos (**células madre embrionarias**). Estas células pueden crecer indefinidamente como poblaciones puras de células madre mientras mantienen la capacidad de generar todos los tipos celulares diferenciados presentes en organismos adultos (**pluripotencialidad**). En consecuencia, se ha suscitado un gran interés por las células madre embrionarias no solo en lo que respecta a las ciencias básicas, sino también por su posible uso como fuente de células para trasplantes. Los estudios en curso sobre las células madre embrionarias han puesto de manifiesto que las células adultas también pueden ser reprogramadas para mostrar la pluripotencialidad característica de las células madre embrionarias, o bien comportarse como un tipo distinto de célula diferenciada. Estos estudios han arrojado luz sobre aspectos nuevos del control del destino celular, y probablemente encontrarán aplicaciones importantes en la medicina regenerativa.

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias fueron cultivadas por primera vez a partir de embriones de ratón en 1981 (**Fig. 18.24**). Pueden propagarse de forma indefinida en cultivo y, si se introducen en embriones tempranos, son capaces de dar lugar a células en todos los tejidos del ratón. Así, hay totipotencia y retienen su capacidad de desarrollarse en todos los tipos celulares diferentes presentes en los tejidos y órganos adultos. Adicionalmente, pueden inducirse para diferenciarse en una diversidad de tipos diferentes de células en cultivo.

Como se describió en el Capítulo 4, las células madre embrionarias han sido una importante herramienta experimental para la biología celular porque pueden emplearse para introducir genes alterados en ratones (véase Fig. 4.35).

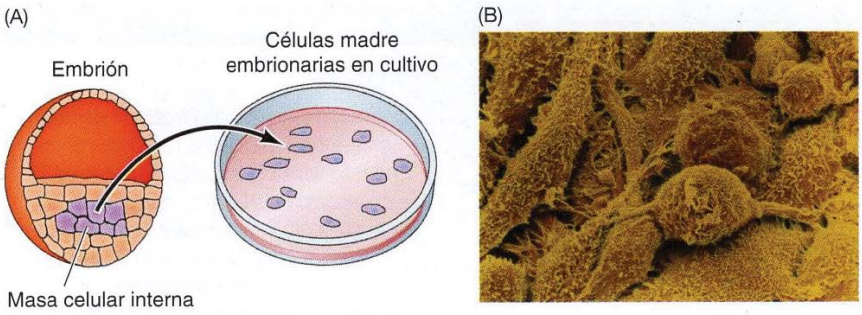


FIGURA 18.24 Cultivo de células madre embrionarias de mamífero. (A) Las células madre embrionarias se cultivan a partir de la masa celular interna de un embrión temprano (blastocisto). (B) Micrografía electrónica de barrido de células madre embrionarias en cultivo.

VÍDEO 18.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v18.3

Células del latido cardíaco diferenciadas. Las células se diferencian en una amplia diversidad de tipos celulares, entre ellos las células sanguíneas, las células epiteliales, los adipocitos, las células de músculos lisos vasculares, las células nerviosas e incluso las células del músculo cardíaco que se encargan de su latido permanente.

Además, proporcionan un sistema modelo sobresaliente para el estudio de los eventos moleculares y celulares asociados con la diferenciación celular embrionaria, de forma que las células madre embrionarias han sido de considerable interés para los biólogos celulares y del desarrollo desde hace tiempo. El interés por estas células alcanzó un nuevo máximo de intensidad, sin embargo, fue en 1998 cuando dos grupos de investigadores describieron el aislamiento de células madre a partir de embriones humanos, surgiendo la posibilidad de emplear las células madre embrionarias en terapias de trasplante clínico.

Las células madre embrionarias de ratón se cultivan en presencia de un factor de crecimiento denominado LIF (factor inhibidor de la leucemia), que señaliza a través de la vía JAK/STAT (véase Fig. 16.25) y es necesario para mantener a estas células en su estado indiferenciado (**Fig. 18.25**). Si se retira el LIF del medio, las células se agregan en estructuras que se parecen a embriones (cuerpos embrioides) y a continuación se diferencian en una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células sanguíneas, células epiteliales, adipocitos, células del músculo liso vascular, células nerviosas, e incluso células de músculo cardíaco que laten. Las células madre embrionarias no requieren LIF pero se mantienen en un estado indiferenciado de forma similar mediante otros factores de crecimiento, que no han sido completamente caracterizados por el momento.

Es importante resaltar que las células madre embrionarias pueden ser dirigidas para diferenciarse a lo largo de vías específicas mediante la adición de los factores de crecimiento apropiados o de moléculas de pequeño tamaño (p. ej., ácido retinoico) al medio de cultivo. Así, puede ser posible derivar población de tipos celulares específicos, como células cardíacas o nerviosas, para terapias de trasplante. Por ejemplo, se han

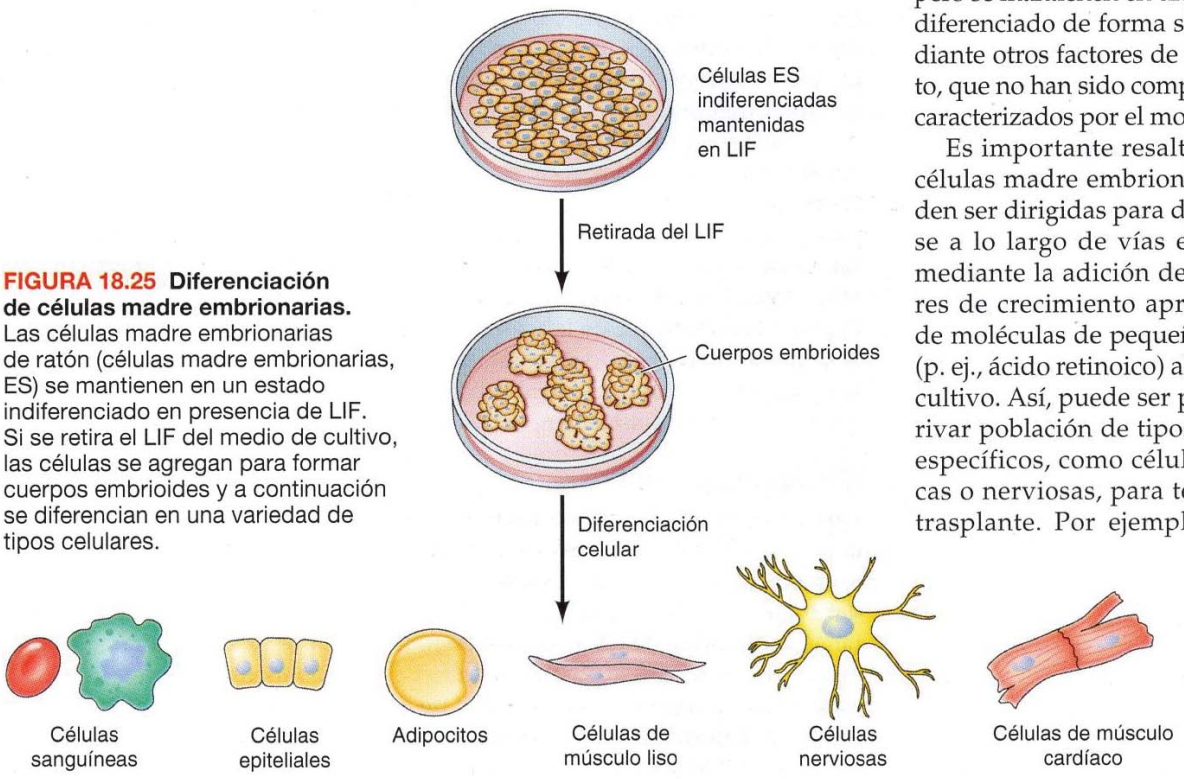


FIGURA 18.25 Diferenciación de células madre embrionarias. Las células madre embrionarias de ratón (células madre embrionarias, ES) se mantienen en un estado indiferenciado en presencia de LIF. Si se retira el LIF del medio de cultivo, las células se agregan para formar cuerpos embrioides y a continuación se diferencian en una variedad de tipos celulares.

FIGURA 18.26 Clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas. (A) El núcleo de una célula somática adulta es transferido a un óvulo sin fertilizar del que se han retirado los cromosomas normales del óvulo (un óvulo enucleado). A continuación el óvulo es cultivado hasta un embrión temprano y es transferido a una madre adoptiva, que dará a luz un clon del donante del núcleo adulto. (B) Dolly (la oveja adulta, izquierda) fue el primer mamífero clonado. Se muestra con su cordero, Bonnie, que fue producida mediante reproducción normal. (Fotografía de Roddy Field; cortesía de T. Wakayama y R. Yanagimachi.)

desarrollado métodos para dirigir la diferenciación de células madre tanto de ratón como del ser humano en miocardiocitos, diversos tipos de neuronas y células pancreáticas productoras de insulina. Estas células diferenciadas se han utilizado para el tratamiento de modelos murinos de arritmia cardíaca, lesiones de la médula espinal en enfermedad de Parkinson, ceguera debida a degeneración macular y diabetes. Las investigaciones actuales se centran en el desarrollo de protocolos para aumentar la eficacia de la diferenciación de células madre embrionarias a lo largo de vías concretas, con lo que se producen poblaciones de células diferenciadas susceptibles de ser utilizadas en tratamientos de trasplante para distintas enfermedades.

Transferencia nuclear de células somáticas

El aislamiento de células embrionarias humanas en 1998 siguió a la primera demostración de que el núcleo de una célula adulta de mamífero podía dar lugar a un animal clonado viable. En 1997 Ian Wilmut y su colaboradores iniciaron una nueva era de la medicina regenerativa con la clonación de la oveja Dolly (**Fig. 18.26**). Dolly surgió del núcleo de una célula epitelial de mamífero que fue trasplantado en un óvulo sin fertilizar en lugar del núcleo normal del óvulo —un proceso denominado **transferencia nuclear de células somáticas**—. Es interesante resaltar que este tipo de experimento se llevó a cabo por primera vez en ranas por John Gurdon en 1962. El hecho de que se tardase casi cuarenta años antes de que se realizara con éxito en mamíferos atestigua la dificultad técnica de este procedimiento. Desde el éxito inicial de Wilmut y sus colaboradores, la transferencia de núcleos desde células somáticas a ovocitos enucleados se ha empleado para crear descendencia clonada en una diversidad de especies de mamífero, incluyendo ovejas, ratones, cerdos, vacas, cabras, conejos y gatos. Sin embargo, la clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas en mamíferos sigue siendo un proceso extremadamente ineficiente, de modo que tan solo el 1%-2% de los embriones generalmente dan lugar a descendencia viva. Además, el bajo número de animales que sobreviven al nacimiento sufren a menudo varias alteraciones, con el re-

VÍDEO 18.4

sites.sinauer.com/cooper7e/v18.4

Control de las células madre con luz. Se han desarrollado métodos para dirigir la diferenciación de las células madre embrionarias de ratón y humanas en diversos tipos de neuronas.

VÍDEO 18.5

sites.sinauer.com/cooper7e/v18.5

Transferencia nuclear de células somáticas. La transferencia nuclear de células somáticas se utiliza para producir clones de células con la misma base genética que el núcleo del donante.

◆ El Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2012 fue concedido conjuntamente a John Gurdon y a Shinya Yamanaka por sus descubrimientos sobre la transferencia nuclear de células somáticas en ranas (1962) y la reprogramación de células somáticas adultas en células madre pluripotentes inducidas (2006), respectivamente.

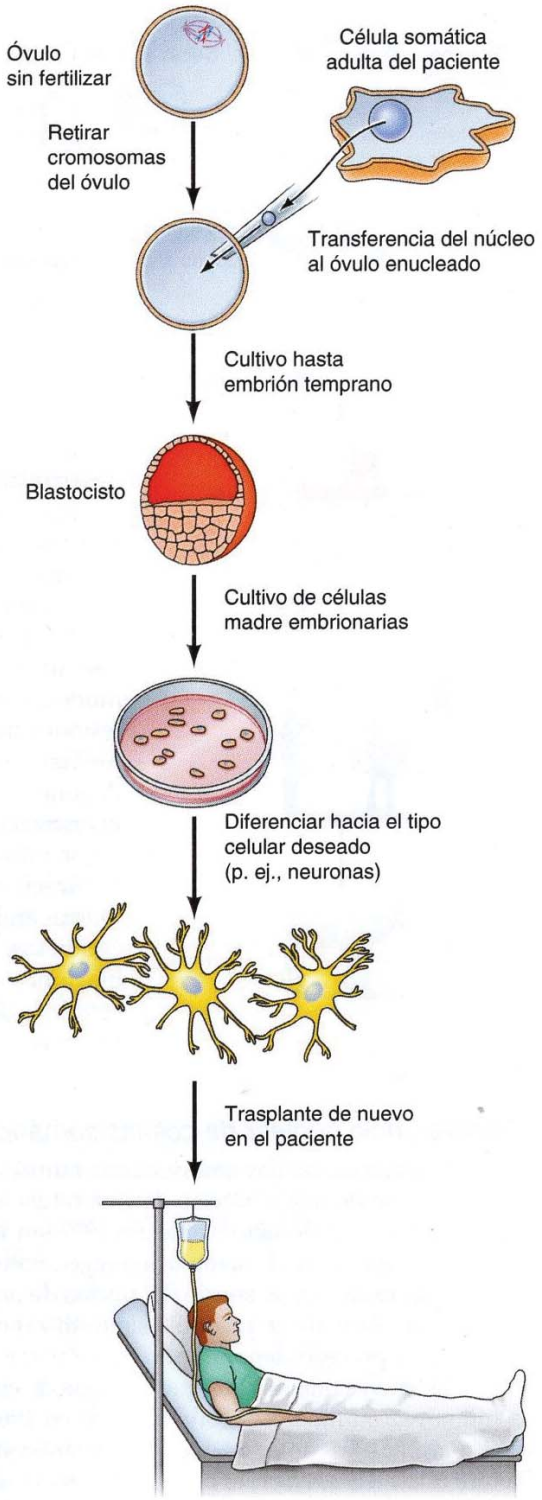


FIGURA 18.27 Clonación terapéutica. En la clonación terapéutica, el núcleo de una célula del paciente sería transferido a un óvulo enucleado, que sería cultivado hasta dar un embrión temprano. A continuación, las células madre embrionarias se derivarían y diferenciarían hacia el tipo celular deseado y trasplantadas de nuevo en el paciente. Las células trasplantadas serían genéticamente idénticas a las del receptor (quien fue el donante del núcleo adulto), de forma que se evitarían las complicaciones de rechazo inmune.

sultado de que la duración de su vida es escasa. Dolly, por ejemplo, solo vivió 6 años, cerca de la mitad de lo que vive una oveja normal. Se cree que la ineficiencia de la clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas y las anomalías frecuentes en los animales clonados reflejan las dificultades inherentes a reprogramar por completo el estado epigenético de un núcleo adulto, incluida la inversión de la metilación del ADN.

La clonación animal mediante transferencia nuclear de células somáticas, junto con las propiedades de las células madre embrionarias, abren la posibilidad de la **clonación terapéutica** (**Fig. 18.27**). En la clonación terapéutica, un núcleo procedente de una célula humana adulta sería transferido a un óvulo enucleado, que sería empleado a continuación para producir un embrión temprano en cultivo. Las células madre embrionarias podrían entonces ser cultivadas a partir del embrión clonado y empleadas para generar los tipos apropiados de células diferenciadas para la terapia de trasplante. Las células madre embrionarias se produjeron por primera vez mediante transferencia nuclear de células somáticas en 2013, lo que respalda la posibilidad de este enfoque. La principal ventaja proporcionada por la clonación terapéutica es que las células madre embrionarias derivadas de este procedimiento serían genéticamente idénticas al receptor del trasplante, que fue el donante del núcleo de la célula somática adulta. Esto sobrepasa la barrera del sistema inmune en el rechazo del tejido trasplantado.

La posibilidad de clonación terapéutica proporciona el acercamiento general al tratamiento de un amplio abanico de trastornos devastadores frente a los cuales podría utilizarse el tratamiento mediante trasplante de células madre. No obstante, aunque se han cosechado algunos éxitos en los modelos animales, siguen existiendo algunos obstáculos considerables que deberán salvarse antes de que la clonación terapéutica pueda aplicarse en el ser humano. Se necesitan mejoras sustanciales para superar la baja eficiencia de los métodos de transferencia de núcleos de células somáticas empleados para producir embriones. Por otra parte, la clonación terapéutica mediante transferencia de núcleos de células somáticas ha suscitado algunas preocupaciones éticas, no solamente con respecto a la posible clonación de personas (**clonación reproductiva**), sino también con relación a la destrucción de los embriones utilizados para obtener las células madre embrionarias. Los adelantos recientes de reprogramación de células somáticas en células totipotenciales similares a células madre embrionarias podrían permitirnos superar estas dificultades.

Células madre totipotenciales inducidas

Debido a las dificultades tanto técnicas como éticas que plantea la obtención de células madre embrionarias mediante transferencia de núcleos de células somáticas, los trabajos que han demostrado la posibilidad de convertir directamente las células somáticas adultas en células madre totipo-

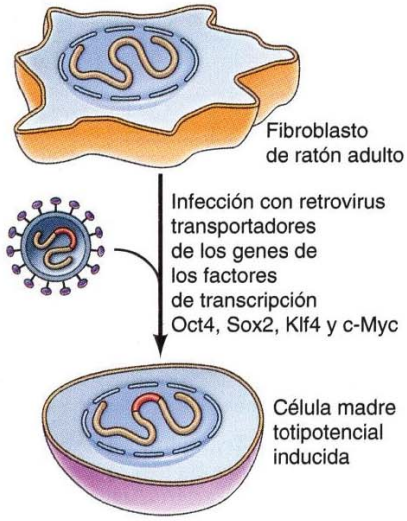


FIGURA 18.28 Células madre totipotenciales inducidas. Los fibroblastos de ratón adulto cultivados *in vitro* se convierten en células madre totipotenciales mediante la infección por vectores retrovirales (véase Fig. 4.30) que portan genes que codifican cuatro factores de transcripción: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc.

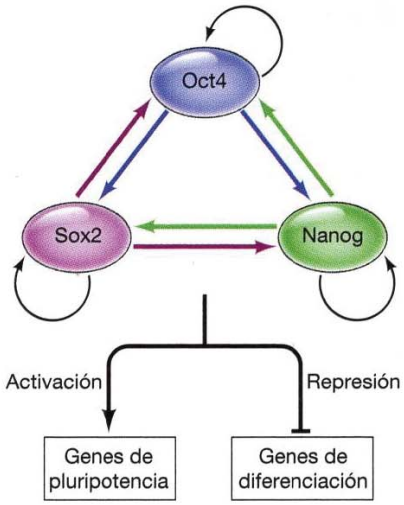


FIGURA 18.29 Programa de transcripción pluripotencial. Los tres factores de transcripción centrales, Oct4, Sox2 y Nanog, mantienen el estado de pluripotencialidad. Estos factores forman bucles autorreguladores positivos, además de activar genes que mantienen la pluripotencialidad y reprimir genes inductores de la diferenciación.

tentes en cultivo han supuesto un enorme adelanto. Esta técnica permite prescindir de los embriones y representa un medio directo de conversión de células somáticas en células madre que, de manera similar a las células madre embrionarias, pueden dar lugar a todos los tejidos de un organismo.

Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka describieron por vez primera la conversión (o reprogramación) de las células somáticas en células madre totipotenciales en 2006. Estos investigadores descubrieron que los fibroblastos de ratón podían reprogramarse para transformarse en células que remedaban las células madre embrionarias (bautizadas como **células madre embrionarias inducidas**) por acción de cuatro factores de transcripción introducidos mediante transferencia de genes retrovirales (**Fig. 18.28**). En otros trabajos posteriores se ha demostrado que las células madre totipotenciales inducidas, de manera similar a las células madre embrionarias, pueden diferenciarse para dar lugar a todos los tipos celulares cuando se introducen en embriones de ratón en una fase temprana de su desarrollo. Cabe destacar que en algunos estudios posteriores se ha demostrado la posibilidad de reprogramar los fibroblastos humanos adultos en células totipotenciales a través de una técnica similar. Por tanto, hoy en día somos capaces de convertir directamente células cutáneas de un paciente en células madre totipotenciales inducidas en condiciones *in vitro*, de modo que disponemos de un nuevo método de obtención de células madre totipotenciales para su aplicación en el tratamiento con trasplante.

El hallazgo de que solo cuatro factores de transcripción clave eran suficientes para reprogramar células somáticas adultas a células madre pluripotenciales resultó llamativo, y estimuló muchas investigaciones sobre los programas de transcripción que controlan el destino celular. La reprogramación de fibroblastos a células madre pluripotenciales inducidas puede desencadenarse no solo con los cuatro factores de transcripción usados inicialmente por Takahashi y Yamanaka (véase Fig. 18.28), sino también por varias combinaciones alternativas de factores de transcripción. Todas estas combinaciones de factores de transcripción inductoras de pluripotencialidad activan un programa de transcripción que también expresan las células embrionarias y que mantiene el estado pluripotencial. Tres factores de transcripción centrales (Oct4, Sox2 y Nanog) son fundamentales en este programa (**Fig. 18.29**). Estos factores forman un bucle autorregulador, por el que actúan conjuntamente regulando en sentido positivo la expresión de los otros. Además, activan la expresión de otros genes que mantienen el estado pluripotencial, mientras que reprimen genes que permiten la diferenciación a linajes celulares específicos. La autorregulación positiva en el centro de este programa de transcripción mantiene la pluripotencialidad, al mismo tiempo que permite que las células se diferencien en respuesta a las señales apropiadas.

Es digno de mención que el mantenimiento autorregulador de la pluripotencialidad haya permitido a los investigadores superar un gran obstáculo al posible uso terapéutico de las células madre pluripotenciales inducidas. En concreto, algunos de los factores de transcripción (p. ej., c-Myc) usados inicialmente para reprogramar fibroblastos (véase Fig. 18.28) pueden funcionar como oncogenes, resultando en un alto riesgo de cáncer tras el trasplante de las células madre pluripotenciales inducidas obtenidas de esta forma. Además, los retrovirus vectores empleados para introducir genes en los fibroblastos pueden causar por sí mismos mutaciones perniciosas que den lugar al desarrollo de cánceres. Sin embargo, actualmente se han desarrollado métodos que permiten generar células madre pluripotenciales mediante la expresión transitoria de los factores reprogramadores, sin precisar la integración estable de genomas víricos ni genes ajenos. Una vez que la célula somática receptora se ha reprogramado al estado pluripotencial, la autorregulación mantiene la pluripotencialidad sin que sea necesaria la expresión mantenida de

los factores de que indujeron inicialmente la reprogramación. Las células madre pluripotentes inducidas generadas por expresión transitoria de factores de reprogramación proporcionan así una fuente sencilla de células madre pluripotentes para trasplante.

Transdiferenciación de células somáticas

El éxito en la reprogramación de células somáticas a células madre pluripotenciales inducidas suscitó la posibilidad de que las células somáticas pudieran ser reprogramadas alternativamente a otros tipos de células diferenciadas, fenómeno denominado **transdiferenciación.** La transdiferenciación se puso de manifiesto por primera vez en 1987, cuando Harold Weintraub y su equipo demostraron que el factor de transcripción MyoD era suficiente para inducir la diferenciación de fibroblastos a miocitos. Con las bases del éxito obtenido en la reprogramación de fibroblastos a células madre pluripotenciales mediante las combinaciones de tres o cuatro factores de transcripción, los científicos han investigado últimamente la posibilidad de que las combinaciones de factores de transcripción sean capaces de inducir la diferenciación de fibroblastos a otros tipos celulares con utilidad potencial en los trasplantes. En particular, se ha conseguido inducir la diferenciación de fibroblastos de ratón a miocitos cardíacos y células nerviosas con las combinaciones apropiadas de solo tres factores de transcripción en cada caso (**Fig. 18.30**). Las células sanguíneas diferenciadas también pueden reprogramarse en otros tipos de células sanguíneas o en células madre hematopoyéticas, que proporcionan potencialmente una nueva fuente de células específicas del paciente para trasplante de células madre hematopoyéticas (véase Fig. 18.23). La transdiferenciación aporta así una vía directa para generar los tipos deseados de poblaciones de células diferenciadas, lo que evita la necesidad de células madre pluripotentes y permite la conversión directa de células adultas de un paciente en células diferenciadas que podrían utilizarse en trasplantes.

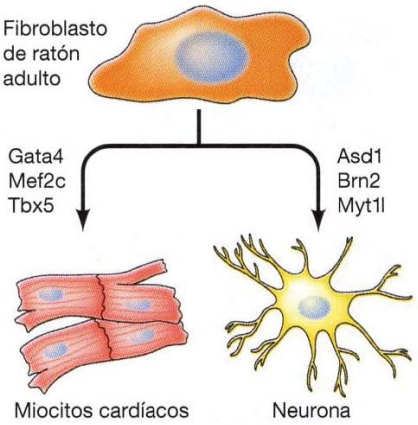


FIGURA 18.30 Transdiferenciación. Las combinaciones de tres factores de transcripción convierten a los fibroblastos en otros tipos celulares diferenciados, como miocitos cardíacos y neuronas.

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Muerte celular programada

Los eventos de la apoptosis: La muerte celular programada juega un papel clave tanto en el mantenimiento de los tejidos adultos como en el desarrollo embrionario. Al contrario que la muerte accidental de las células como consecuencia de una lesión aguda, la muerte celular programada tiene lugar vía un proceso activo de apoptosis. Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son a continuación eliminados con eficacia mediante fagocitosis. Los genes responsables de la regulación y ejecución de la apoptosis fueron inicialmente identificados mediante el análisis genético de *C. elegans.*

Ver Animación 18.1 y Vídeo 18.1

muerte celular programada, necrosis, apoptosis

Caspasas: los ejecutores de la apoptosis: Las caspasas son una familia de proteasas que son las efectoras de la apoptosis. Las caspasas se clasifican como caspasas iniciadoras o efectoras, y ambas funcionan en una cascada que lleva hacia la muerte celular. Las caspasas efectoras surcan más de 100 proteínas celulares para causar los sucesos apoptósicos.

caspasa

Reguladores centrales de la apoptosis: la familia Bcl-2: Los miembros de la familia Bcl-2 son reguladores centrales de la activación de las caspasas y de la apoptosis. Algunos miembros de la familia Bcl-2 funcionan inhibiendo la apoptosis (antiapoptóticos) mientras que otros actúan estimulando la apoptosis (proapoptóticos). Las señales que controlan la muerte celular programada alteran el equilibrio entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2, que se regulan entre sí. En las células de mamífero, los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 actúan en las mitocondrias, donde estimulan la liberación de citocromo *c*, desencadenando la activación de las caspasas. Las caspasas también están reguladas directamente mediante las proteínas inhibidoras IAP.

Ver Animación 18.2

Bcl-2, apoptosoma, IAP

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Vías de señalización que regulan la apoptosis: Una diversidad de vías de señalización regulan la apoptosis, controlando la expresión o la actividad de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. Estas vías incluyen la activación inducida por el ADN lesionado del supresor tumoral p53, la activación estimulada por factores de crecimiento de la señalización mediada por PI 3-quinasa/Akt, y la activación de los receptores de muerte mediada por polipéptidos que inducen la muerte celular programada.

Ver Vídeo 18.2

p53, PI 3-quinasa, Akt, factor de necrosis tumoral (TNF)

Vías alternativas de muerte celular programada: La autofagia y la necrosis regulada son dos mecanismos alternativos de apoptosis en la inducción de la muerte celular programada.

autofagia, necroptosis

Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos

Proliferación de las células diferenciadas: La mayoría de las células en los animales adultos están detenidas en fase G_0 del ciclo celular. Algunos tipos de células diferenciadas, incluidos los fibroblastos de la piel, las células endoteliales, las células de músculo liso y las células hepáticas son capaces de reiniciar la proliferación a medida que sea necesario para reemplazar células que se han perdido como consecuencia de una lesión o de la muerte celular.

Células madre: La mayoría de las células diferenciadas no proliferan ellas mismas, sino que pueden ser sustituidas mediante la proliferación de células madre. Las células madre se dividen para dar lugar a una célula hija que sigue siendo una célula madre, y otra que se divide y se diferencia. Las células madre han sido identificadas en una amplia variedad de tejidos adultos, incluyendo el sistema hematopoyético, la piel, el intestino, el músculo esquelético, el cerebro y el corazón.

célula madre, nicho

Aplicaciones médicas de las células madre de adulto: La capacidad de las células madre de reparar tejido dañado sugiere su potencial uso en la medicina clínica. Las células madre de adulto se emplean para reparar lesiones del sistema hematopoyético mediante células madre hematopoyéticas. Sin embargo, las aplicaciones clínicas de las células madre de adulto están limitadas por las dificultadas asociadas con el aislamiento y cultivo de estas células.

trasplante de células madre hematopoyéticas, trasplante de médula ósea

Células madre pluripotenciales, reprogramación celular y medicina regenerativa

Células madre embrionarias: Las células madre embrionarias se cultivan a partir de embriones tempranos. Pueden crecer con relativa sencillez en el estado indiferenciado en cultivo mientras que mantienen su capacidad de diferenciarse de toda la variedad de tipos celulares, de modo que puede ofrecer ventajas considerables sobre las células madre de adulto en muchas aplicaciones clínicas.

Ver Vídeos 18.3 y 18.4

células madre embrionarias, pluripotenciales

Transferencia nuclear de células somáticas: Los mamíferos han sido clonados mediante transferencia nuclear de células somáticas en la que el núcleo de una célula somática adulta es trasplantado en un óvulo enucleado. Esto abre la posibilidad de la clonación terapéutica en la que las células madre embrionarias se derivarían a partir de un núcleo clonado. A pesar de que se deben superar muchos obstáculos, la posibilidad de la clonación terapéutica ofrece promesas para el desarrollo de nuevos tratamientos para una diversidad de patologías devastadoras.

Ver Vídeo 18.5

transferencia nuclear de células somáticas, clonación terapéutica, clonación reproductiva

Células madre totipotenciales inducidas: Las células somáticas adultas pueden convertirse en células madre totipotenciales en condiciones *in vitro* por acción de cuatro factores de transcripción, lo que podría suponer un método alternativo del uso de células madre para el trasplante terapéutico.

células madre totipotenciales inducidas

Transdiferenciación de células somáticas: Las células somáticas también pueden convertirse directamente en otros tipos celulares diferenciados, como miocitos cardíacos y neuronas, mediante las combinaciones apropiadas de factores de transcripción.

transdiferenciación

Preguntas

1. ¿Por qué la muerte celular vía apoptosis es más ventajosa para los organismos multicelulares que la muerte celular vía lesión aguda?
2. ¿Qué mecanismos moleculares regulan la actividad de las caspasas?
3. Has expresado mutantes de lamininas nucleares en fibroblastos humanos. El residuo de Asp en la diana de escisión de las caspasas ha sido mutado a una Glu en estas lamininas. ¿Cómo afectarían estas lamininas mutantes a la progresión de la apoptosis?
4. ¿Cómo regulan las proteínas de la familia Bcl-2 la apoptosis en células de mamífero?
5. ¿Cómo afecta la activación de p53 en respuesta al ADN lesionado a la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular?
6. Has construido un mutante de Bad en el que la diana para la fosforilación por Akt ha sido mutada, de forma que Akt ya no la fosforila. ¿Cómo afectaría la expresión de este mutante a la supervivencia celular?
7. ¿Cómo afectaría a la apoptosis la expresión de ARNsi dirigido frente a las proteínas 14-3-3?
8. ¿Cómo afectaría el ARNsi frente a Ced-3 al desarrollo de *C. elegans*?
9. Muchos tejidos adultos contienen células diferenciadas de forma terminal que son incapaces de proliferar. Sin embargo, estos tejidos pueden regenerarse después de una lesión. ¿Qué les confiere a estos tejidos su capacidad regenerativa?
10. ¿Cuál es la propiedad crítica de las células madre?
11. ¿Cuáles son las ventajas potenciales de las células madre embrionarias en comparación con las células madre de adulto para las aplicaciones terapéuticas?
12. ¿Cuáles son las posibles ventajas de las células madre pluripotenciales inducidas respecto a las embrionarias?

Bibliografía

Muerte celular programada

Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser and J. M. Adams. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 49–63. [R]

Danial, N. K. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116: 205–219. [R]

Ellis, H. M. and H. R. Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817–829. [P]

Fuchs, Y. and H. Steller. 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147. 742–758. [R]

Gyrd-Hansen, M. and P. Meier. 2010. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- B, inflammation and cancer. *Nature Rev. Cancer* 10: 561–574. [R]

Hay, B. A. and M. Guo. 2006. Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 623–650. [R]

Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776. [R]

Holcik, M. and N. Sonenberg. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 318–327. [R]

Jope, R. S. and G. V. W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95–102. [R]

Lauber, K., S. G. Blumenthal, M. Waibel and S. Wesselborg. 2004. Clearance of apoptotic cells: Getting rid of the corpses. *Mol. Cell* 14: 277–287. [R]

Levine, B. and G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27–42. [R]

Moldoveanu, T., A. V. Follis, R. W. Kriwacki and D. R. Green. 2014. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* 39: 101–111. [R]

Riedl, S. J. and G. S. Salvesen. 2007. The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 405–413. [R]

Samejima, K. and W. C. Earnshaw. 2005. Trashing the genome: The role of nucleases during apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 677–688. [R]

Suzuki, J., D. P. Denning, E. Imanishi, H. R. Horvitz and S. Nagata. 2013. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* 341: 403–406. [P]

Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231–241. [R]

Vandanabeele, P., L. Galluzzi, T. V. Berghe and G. Kroemer. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 700–714. [R]

Vaux, D. L. and J. Silke. 2005. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 287–297. [R]

Vousden, K. H. and X. Lu. 2002. Live or let die: The cells response to p53. *Nature Rev. Cancer* 2: 594–604. [R]

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* 296: 1635–1636. [R]

Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos

Blanpain, C. and E. Fuchs. 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 207–217. [R]

Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.* 9: 653–660. [R]

Clevers, H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154: 274–284. [R]

Clevers, H., K. M. Loh and R. Nusse. 2014. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346: 1248012. [R]

Daley, G. Q. and D. T. Scadden. 2008. Prospects for stem cell-based therapy. *Cell* 132: 544–548. [R]

Dhawan, J. and T. A. Rando. 2005. Stem cells in postnatal myogenesis: Molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 15: 666–672. [R]

Fuchs, E. and V. Horsley. 2008. More than one way to skin… *Genes Dev.* 22: 976–985. [R]

Jones, D. L. and A. J. Wagers. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 11–21. [R]

Kuang, S. and M. A. Rudnicki. 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14: 82–91. [R]

McCulloch, E. A. and J. E. Till. 2005. Perspectives on the properties of stem cells. *Nature Med.* 11: 1026–1028. [R]

Morrison, S. J. and A. C. Spradling. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132: 598–611. [R]

Orkin, S. H. and L. I. Zon. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132: 631–644. [R]

Shi, X. and D. J. Garry. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20: 1692–1708. [R]

Simons, B. D. and H. Clevers. 2011. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* 145: 851–862. [R]

Taub, R. 2004. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 836–847. [R]

Van Berlo, J. H. and J. D. Molkentin. 2014. An emerging consensus on cardiac regeneration. *Nature Medicine* 20: 1386–1393. [R]

Wu, S. M., K. R. Chien and C. Mummery. 2008. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell* 132: 537–543. [R]

Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645–660. [R]

Células madre pluripotenciales, reprogramación celular y medicina regenerativa

Cohen, D. E. and D. Melton. 2011. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nature Rev. Genet.* 12: 243–252. [R]

Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987–1000. [P]

Fox, I. J., G. Q. Daley, S. A. Goldman, J. Huard, T. J. Kamp and M. Trucco. 2014. Use of differentiated pluripotent stem cells in replacement therapy for treating disease. *Science* 345: 1247391. [R]

Hanna, J. H., K. Saha and R. Jaenisch. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143: 508–525. [R]

Ieda, M., J.-D. Fu, P. Delgado-Olguin, V. Vedantham, Y. Hayashi, B. G. Bruneau and D. Srivastava. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142: 375–386. [P]

Ladewig, J., P. Koch and O. Brüstle. 2013. Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 225–236. [R]

Pagliuca, F. W., J. R. Milman, M. Gürtier, M. Segel, A. Van Devort, J. H. Ryu, Q. P. Peterson, D. Greiner and D. A. Melton. 2014. Generation of functional human pancreatic *b* cells *in vitro*. *Cell* 159: 428–439. [P]

Park, I.-H., R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch and G. Q. Daley. 2007. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141–147. [P]

Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins and J. D. Gearhart. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13726–13731. [P]

Tabar, V. and L. Studer. 2014. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nature Rev. Genet.* 15: 82–92. [R]

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872. [P]

Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676. [P]

Thompson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknotz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145–1147. [P]

Vierbuchen, T., A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Sudhof and M. Wernig. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035–1042. [P]

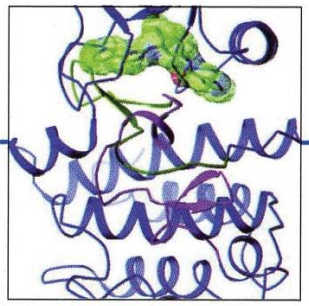
Wilmut, I., N. Beaujean, P. A. de Sousa, A. Dinnyes, T. J. King, L. A. Paterson, D. N. Wells and L. E. Young. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583–586. [R]

Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813. [P]

Wu, S. M. and K. Hechedlinger. 2011. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature Cell Biol.* 13: 497–505. [R]

Young, R. A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144: 940–954. [R]

Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin and J. A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920. [P]



Capítulo 19

Cáncer

Desarrollo y causas del cáncer 723

Virus tumorales 733

Oncogenes 737

Genes supresores de tumores 749

Enfoques moleculares para el tratamiento del cáncer 759

EXPERIMENTO CLAVE:

Descubrimiento de los proto-oncogenes 740

MEDICINA MOLECULAR:

Imatinib: Tratamiento del cáncer dirigido contra el oncogén *bcr/abl* 763

El cáncer es un tema apropiado para el último capítulo de este libro, ya que se debe a la alteración de los mecanismos reguladores que dirigen el comportamiento de la célula normal. Como ya se trató en capítulos anteriores, la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células individuales en los organismos pluricelulares se regulan cuidadosamente para atender los requerimientos del organismo como un todo. Esta regulación no existe en las células cancerosas, que crecen y se dividen de una manera incontrolada, y que en última instancia se propagan por todo el cuerpo e interfieren con la función de los tejidos y de los órganos sanos.

Puesto que el cáncer se debe a alteraciones en los mecanismos fundamentales de la regulación celular, es una enfermedad que en último término ha de ser caracterizada a los niveles molecular y celular. En efecto, la comprensión del cáncer ha sido un objetivo de los biólogos moleculares y celulares durante muchos años. De igual forma, el estudio de las células cancerosas también ha ayudado a esclarecer los mecanismos que regulan el comportamiento de las células sanas. De hecho, muchas de las proteínas que desempeñan papeles clave en la señalización celular en la regulación del ciclo celular, y en el control de la muerte celular programada se identificaron por primera vez porque alteraciones en su actividad causaban la proliferación incontrolada de las células cancerosas. Por tanto, el estudio del cáncer ha contribuido de manera significativa a nuestro conocimiento de la regulación de las células sanas y viceversa.

Desarrollo y causas del cáncer

La principal alteración que causa el desarrollo de un cáncer es la proliferación continua e incontrolada de las células cancerosas. En vez de responder apropiadamente a las señales que controlan el comportamiento celular normal, las células cancerosas crecen y se dividen de manera incontrolada, invadiendo los tejidos y los órganos sanos y, finalmente, diseminándose por todo el cuerpo. La pérdida generalizada del control del crecimiento que muestran las células cancerosas es el resultado neto de la acumulación de alteraciones en múltiples sistemas reguladores de la célula, y se refleja en varios aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de sus equivalentes sanas.

VÍDEO 19.1

sites.sinauer.com/cooper7e/v19.1

Células normales y cancerosas. En lugar de responder de forma adecuada a las señales que controlan el comportamiento celular normal, las células cancerosas crecen y se dividen de una forma descontrolada.

Tipos de cáncer

El **cáncer** se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de 100 tipos

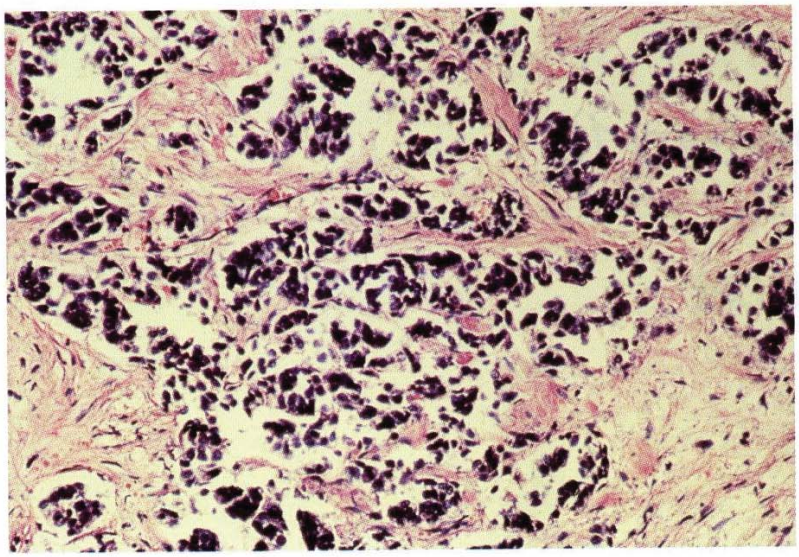


FIGURA 19.1 Cáncer de páncreas. Micrografía de luz de una sección a través de páncreas en la que se observa un cáncer pancreático. Las células cancerosas poseen núcleos de color violeta, y están invadiendo el tejido normal (rosa).

◆ La descripción más temprana del cáncer se encuentra en un papiro egipcio que data de en torno al 3000 a C. Se cree que Hipócrates fue quien acuñó la palabra cáncer. Al parecer, la forma de los tumores le recordaron a los cangrejos y empleó las palabras carcinos, carcinoma y cáncer, que se refieren a cangrejos en griego, para describir los tumores.

distintos de cáncer que pueden diferir sustancialmente en su comportamiento y respuesta al tratamiento. La cuestión más importante en la patología del cáncer es distinguir entre tumores benignos y malignos. Un **tumor** es una proliferación anormal de las células, que puede ser benigno o maligno. Un **tumor benigno**, como las verrugas comunes de la piel, permanece confinado en su localización original, sin invadir el tejido sano adyacente ni propagarse a lugares distantes del cuerpo. Sin embargo, un **tumor maligno** es capaz de invadir el tejido normal adyacente (**Fig. 19.1**) y de propagarse por el cuerpo mediante los sistemas circulatorio o linfático (**metástasis**). Sólo a los tumores malignos se les denomina propiamente como cánceres, y es su capacidad para invadir y dar lugar a la metástasis lo que convierte al cáncer en algo tan peligroso. Mientras que los tumores benignos pueden eliminarse mediante cirugía, la difusión de los tumores malignos a lugares del cuerpo distantes los suele hacer resistentes a este tratamiento local.

Tanto los tumores malignos como los benignos se clasifican de acuerdo al tipo de célula del que proceden. La mayoría de los cánceres se incluyen en uno de tres tipos principales: carcinomas, sarcomas y leucemias o linfomas. Los **carcinomas**, que incluyen aproximadamente al 90% de los cánceres humanos, son alteraciones de las células epiteliales. Los **sarcomas**, que son raros en humanos, son tumores sólidos de tejidos conectivos, como el músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso. Las **leucemias** y los **linfomas**, que contabilizan aproximadamente el 8% de los casos en humanos, surgen a partir de las células hematopoyéticas y de las células del sistema inmune, respectivamente. Estos tumores se clasifican a su vez atendiendo al tejido de origen (p. ej., carcinoma de pulmón o de mama) y al tipo de célula involucrada. Por ejemplo, los fibrosarcomas surgen a partir de los fibroblastos, y las leucemias eritroides a partir de los precursores de los eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos).

Aunque hay muchos tipos de cáncer, sólo son mayoritarios unos pocos (**Tabla 19.1**). En Estados Unidos se diagnostican anualmente 1,5 millones de casos de cáncer, y más de 600.000 americanos mueren de cáncer al año. Casi el 80% de la incidencia total del cáncer se debe a los que afectan a 12 zonas distintas del cuerpo. Los cánceres más comunes, que constituyen más de la mitad de los casos de cáncer, son los de mama, próstata, pulmón y colon/recto. El cáncer de pulmón, con mucho el más letal, es el responsable de más del 25% de todas las muertes por cáncer.

ANIMACIÓN 19.1

sites.sinauer.com/cooper7e/a19.1

Metástasis de un cáncer. Un cáncer comienza cuando una célula alterada da lugar a una población celular proliferativa, formando un tumor primario del que pueden desprenderse células para formar tumores secundarios en otros puntos del cuerpo.

◆ A pesar de que el cáncer ha estado con nosotros a lo largo de la historia del hombre, se ha convertido en una de las principales causas de muerte sólo en el último siglo. Antes de 1900, la mayoría de las muertes se debían a enfermedades infecciosas, como la neumonía y la tuberculosis, y la esperanza de vida era inferior a los 50 años. El cáncer era una patología infrecuente que era responsable de un pequeño porcentaje de las muertes.

TABLA 19.1 Cánceres más frecuentes en Estados Unidos

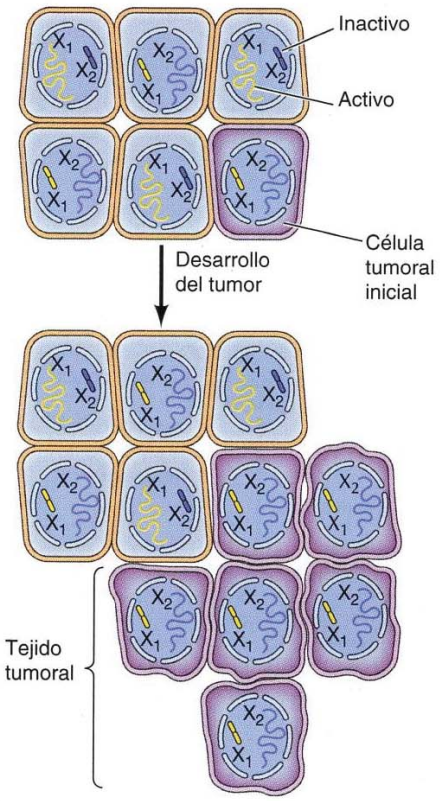
Localización del cáncer	Casos por año	Muertes por año
Mama	234.200 (14,1%)	40.700 (6,9%)
Pulmón	221.200 (13,3%)	158.000 (26,8%)
Próstata	220.800 (13,3%)	27.500 (4,7%)
Colon/recto	102.500 (6,2%)	49.700 (8,4%)
Linfomas	80.900 (4,9%)	20.900 (3,5%)
Vejiga	74.000 (4,5%)	16.000 (2,7%)
Piel (melanoma)	73.900 (4,5%)	9.900 (1,7%)
Útero	67.700 (4,1%)	14.300 (2,4%)
Tiroides	62.500 (3,8%)	1.900 (0,3%)
Riñón	61.600 (3,7%)	14.100 (2,4%)
Leucemia	54.300 (3,3%)	24.500 (4,2%)
Páncreas	49.000 (2,9%)	40.600 (6,9%)
Subtotal	1.303.000 (78,6%)	418.100 (70,9%)
Todos los sitios	1.658.000 (100%)	589.400 (100%)

Fuente: American Cancer Society, *Cancer Facts and Figures—2015*.

VÍDEO 19.2

sites.sinauer.com/cooper7e/v19.2

Células de cáncer de mama en división. Las células tumorales migran y crecen según pautas desordenadas y en varias capas



Desarrollo del cáncer

Una de las características fundamentales del cáncer es que los tumores son clones, es decir, los tumores se desarrollan a partir de una única célula que prolifera de manera anormal. El origen de muchos tumores a partir de una única célula se ha demostrado mediante el análisis de la inactivación del cromosoma X (**Fig. 19.2**). Como ya se trató en el Capítulo 6, un miembro del par de cromosomas X se inactiva en las células femeninas y pasa al estado de heterocromatina. La inactivación del cromosoma X ocurre al azar durante el desarrollo embrionario, por lo que uno de los cromosomas X es inactivado en algunas células mientras que en otras se inactiva el otro cromosoma X. Por tanto, si una hembra es heterocigota para un gen del cromosoma X, se expresarán alelos distintos en células distintas. Los tejidos sanos se componen de una mezcla de células con cromosomas X inactivos diferentes, por lo que en los tejidos normales de hembras heterocigotas se detecta la expresión de ambos alelos. Por el contrario, en los tejidos tumorales se suele expresar sólo un alelo de un gen heterocigoto portado por el cromosoma X. Esto implica que todas las células que constituyen ese tumor derivan de una única célula original, en la que se fijó el patrón de inactivación del cromosoma X antes de que el tumor se desarrollara.

Sin embargo, el origen clonal de los tumores no implica que la célula progenitora original que da lugar al tumor tenga, en principio, todas las características de una célula cancerosa. Por el contrario, el desarrollo del cáncer es un proceso «multietapa», en el que las células se convierten en malignas progresivamente a través de una serie de alteraciones. Un dato que indica el desarrollo multietapa del cáncer es que la mayoría de los cánceres se desarrollan en las etapas tardías de la vida. Por ejemplo, la incidencia del cáncer de colon se incrementa por un factor de más de diez entre los 30 y 50 años de edad, y por otro factor de diez, entre los 50 y 70 años (**Fig. 19.3**). Este gran incremento en la incidencia de cáncer con la edad se debe a que la mayoría de los cánceres se desarrolla como consecuencia de múltiples anomalías, que se acumulan a lo largo de muchos años.

FIGURA 19.2 Carácter clónico de los tumores. Un tejido normal es un mosaico de células en las que uno de los cromosomas X diferentes (X_1 y X_2) se ha inactivado. Los tumores se desarrollan a partir de una única célula inicial alterada, por lo que cada célula tumoral mostrará el mismo patrón de inactivación de X (X_1 inactivo, X_2 activo).

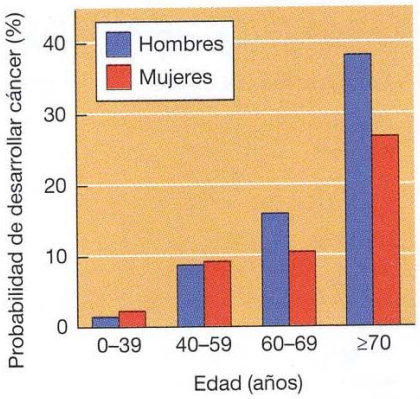


FIGURA 19.3 Incremento de la tasa de cáncer de colon con la edad. Tasa de muertes anuales por cáncer de colon en Estados Unidos. (Datos de American Cancer Society, *Cancer Facts and Figures 2015*.)

A nivel celular, el desarrollo del cáncer se considera un proceso multietapa constituido por la mutación y selección de aquellas células con una capacidad cada vez mayor de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (**Fig. 19.4**). El primer paso del proceso, la **iniciación del tumor**, se considera que se debe a una alteración genética que provoca la proliferación anormal de una única célula. La proliferación celular da lugar a una población clonal de células tumorales. La **progresión del tumor** se produce a medida que se producen mutaciones adicionales en las células de la población del tumor. Las células tumorales muestran normalmente un alto grado de inestabilidad genética, que produce una frecuencia elevada de mutaciones y anomalías cromosómicas. Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a la célula, como por ejemplo, un crecimiento más rápido, y los descendientes de las células que portan dicha mutación dominarán en la población tumoral. Este proceso se denomina **selección clonal**, puesto que un nuevo clon de células tumorales evoluciona en función de su ritmo de crecimiento más rápido o de otras propiedades (como la supervivencia, invasión o metástasis) que le confieren una ventaja selectiva. La selección clonal continúa durante el desarrollo del tumor, por lo que los tumores cada vez crecen más deprisa y aumenta cada vez más su carácter maligno.

Los estudios de los carcinomas de colon proporcionan un claro ejemplo de la progresión tumoral durante el desarrollo de una alteración maligna humana común (**Fig. 19.5**). El primer estadio en el desarrollo del tumor es el aumento de la proliferación de las células epiteliales de colon. Una de las células de esta población en crecimiento dará lugar a una pequeña neoplasia benigna (un **adenoma** o **pólipo**). Posteriores rondas de selección clonal dan lugar al crecimiento de adenomas de un tamaño y potencial proliferativo cada vez mayor. Entonces surgen carcinomas malignos a partir de los adenomas benignos, lo cual se reconoce por la invasión de las células tumorales a través de la lámina basal hasta el tejido conectivo subyacente. A partir de aquí, las células cancerosas continúan proliferando y se propagan a través de los tejidos conectivos de la pared del colon. Finalmente, las células cancerosas atraviesan la pared del colon e invaden otros órganos abdominales, como la vejiga o el intestino delgado. Además, las células cancerosas invaden los vasos sanguíneos y linfáticos, lo que les permite formar metástasis por todo el cuerpo.

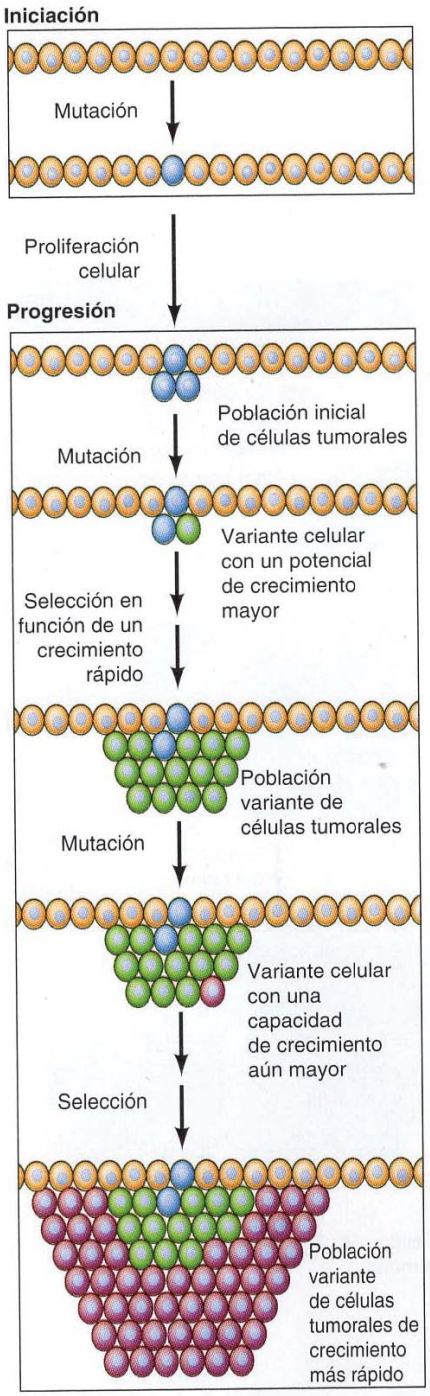


FIGURA 19.4 Etapas del desarrollo de un tumor. El desarrollo de un cáncer se inicia cuando una única célula que ha sufrido una mutación comienza a proliferar de manera anormal. Mutaciones adicionales, a las que les sigue una selección de aquellas células de la población en función de su ritmo de crecimiento, dan lugar a la progresión del tumor caracterizado por un crecimiento más rápido y una mayor malignidad.

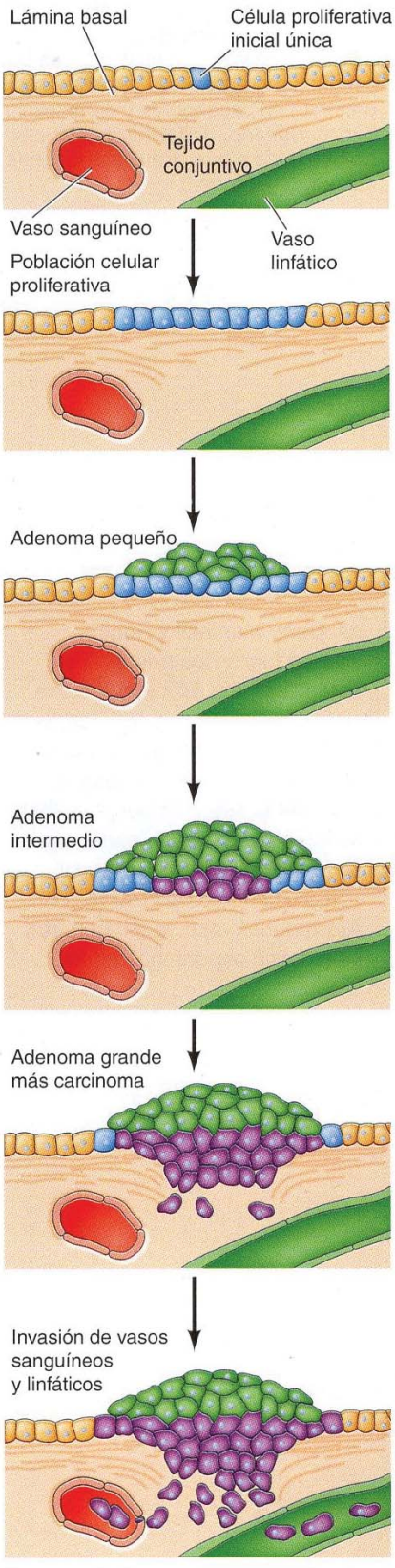


FIGURA 19.5 Desarrollo de carcinomas de colon. Una única célula alterada da lugar a una población celular proliferativa, que primero evoluciona a adenomas benignos de un tamaño cada vez mayor, y posteriormente a un carcinoma maligno. Las células cancerosas invaden entonces el tejido conectivo subyacente y penetran en los vasos sanguíneos y linfáticos, distribuyéndose de esta manera por todo el cuerpo.

Causas del cáncer

Las sustancias que causan cáncer, denominadas **carcinógenos**, se han identificado mediante estudios en animales de experimentación y mediante análisis epidemiológicos de la frecuencia del cáncer en las poblaciones humanas (p. ej., la elevada incidencia de cáncer de pulmón entre los fumadores). Puesto que el desarrollo del carácter maligno es un proceso multietapa complejo, son muchos los factores que pueden influir en el desarrollo del cáncer y, en la mayoría de los cánceres, es simplista hablar de una única causa. De todas maneras, se han encontrado muchos agentes, entre los que se incluyen la radiación, productos químicos y virus, que inducen cáncer tanto en animales de experimentación como en humanos.

La radiación y muchos carcinógenos químicos (**Fig. 19.6**) actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. Alguno de los carcinógenos que contribuyen a causar cánceres humanos son la radiación ultravioleta del sol (la principal causa de cáncer de piel), los productos químicos carcinógenos en el humo del tabaco, y la aflatoxina (un potente carcinógeno hepático producido por algunos mohos que contaminan reservas de cacahuetes y de otros tipos de grano almacenadas de forma inadecuada). Los carcinógenos en el humo del tabaco (incluyendo el benzo(*a*)pireno, la dimetilnitrosamina y los compuestos de níquel) son las principales causas identificadas de cáncer en el hombre. Fumar es la causa indiscutible de casi el 90% de los cánceres de pulmón, e igualmente está implicado en los cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe, esófago y otras partes. En total, se estima que fumar es la causa de casi un tercio de todas las muertes por cáncer —una mortalidad impresionante para un único agente carcinógeno.

Otros carcinógenos contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular, en vez de induciendo mutaciones. Estos compuestos se denominan **promotores tumorales**, puesto que el incremento de la división celular que inducen se requiere para el desarrollo de una población celular proliferativa durante los primeros estadios del desarrollo del tumor. Por otra parte, la proliferación celular inducida por los promotores tumorales produce mutaciones que se producen inevitablemente durante la replicación del ADN. Las hormonas, particularmente los estrógenos, son importantes como promotores de tumores en el desarrollo de algunos cánceres humanos. Por ejemplo, la proliferación de las células del endometrio uterino es estimulada por los estrógenos, y la exposición a un exceso de estrógenos incrementa de manera significativa la posibilidad de que una mujer acabe desarrollando un cáncer de endometrio. Por tanto, la terapia basada en altas dosis de estrógenos durante largo tiempo para tratar la menopausia incrementa el riesgo de cáncer de endometrio. Afortunadamente este riesgo disminuye administrando progesterona para contrarrestar el efecto estimulador de los estrógenos en la proliferación celular en el endometrio. Sin embargo, la terapia durante largo tiempo basada en la combinación de estrógenos y progesterona puede incrementar el riesgo de cáncer de mama. Otros carcinógenos promotores de tumores en humanos son asbesto, algunos virus que provocan inflamación crónica, y la bacteria *Helicobacter pylori*, causante de cáncer de estómago.

Los cánceres humanos más comunes causados por virus incluyen el cáncer hepático y el carcinoma cervical, que juntos son responsables de entre el

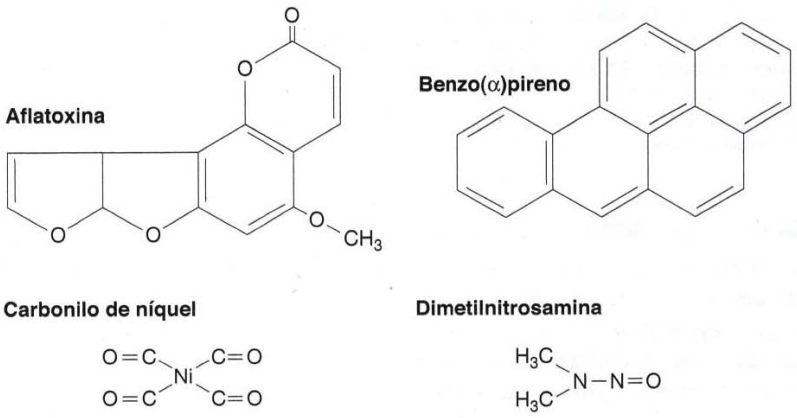


FIGURA 19.6 Estructura de carcinógenos químicos representativos. La aflatoxina es un carcinógeno producido por el moho presente en cacahuetes y cereales; benzo(α)pireno, dimetilnitrosamina, y carbonilo de níquel son carcinógenos del humo del tabaco.

10% y el 20% de las causas de cáncer en el hombre, pero como se analiza más adelante en este capítulo, los estudios de los virus tumorales han jugado un papel clave en la dilucidación de los eventos responsables del desarrollo de cánceres inducidos por carcinógenos tanto virales como no virales.

Propiedades de las células cancerosas

El crecimiento incontrolado de las células cancerosas se debe a la acumulación de alteraciones que afectan a muchos de los mecanismos de la regulación celular que se han visto en los capítulos anteriores. Esta relación se observa en muchos de los aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de las células normales. Las células cancerosas manifiestan alteraciones en los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular normal. En conjunto, estas propiedades características de las células cancerosas permiten una descripción a nivel celular del carácter maligno.

Las células en cultivo simulan la proliferación incontrolada de las células cancerosas *in vivo*. Una primera diferencia entre las células cancerosas y las células normales en cultivo es que las células normales muestran una **inhibición de la proliferación dependiente de la densidad** (**Fig. 19.7**). Las célu-

◆ Barry Marshall y Robin Warren fueron los primeros en establecer una asociación entre *Helicobacter pylori* y las úlceras estomacales. Para demostrar que *H. pylori* es el agente causal de las úlceras estomacales, Marshall se infectó deliberadamente con un cultivo puro del microbio y estudió el curso de la infección. Afortunadamente, la enfermedad se resolvió espontáneamente.

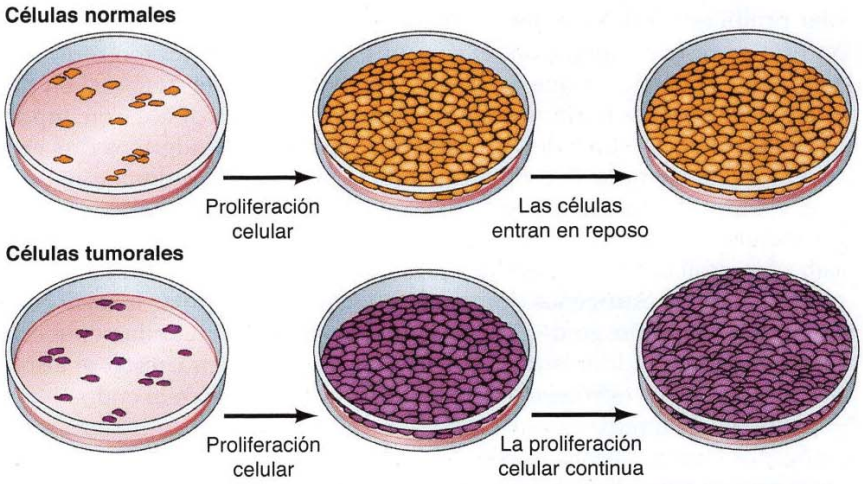


FIGURA 19.7 Inhibición dependiente de la densidad. Las células normales proliferan en cultivo hasta que se alcanza una determinada densidad celular; a partir de entonces las células permanecen en reposo. Sin embargo, las células tumorales siguen proliferando con independencia de la densidad celular alcanzada.

ANIMACIÓN 19.2

sites.sinauer.com/cooper7e/a19.2

Inhibición dependiente de la densidad. En cultivo, las células normales proliferan hasta que alcanza una determinada densidad celular, pero las células tumorales continúan proliferando independientemente de la densidad celular.

las normales proliferan hasta alcanzar una densidad celular determinada, en función de la disponibilidad de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo (normalmente en forma de suero). Entonces cesa su proliferación y permanecen en reposo, detenidas en la fase G_0 del ciclo celular (véase Fig. 17.5). Sin embargo, la proliferación de la mayoría de las células cancerosas no es sensible a esta inhibición dependiente de la densidad. En vez de responder a las señales que hacen que las células normales dejen de proliferar y entren en G_0, las células tumorales siguen creciendo hasta alcanzar una densidad elevada de células en cultivo, de la misma manera que ocurre con la proliferación incontrolada *in vivo*.

Del mismo modo, los fibroblastos normales se desplazan por la superficie de una placa de cultivo hasta que establecen contacto con una célula adyacente. Entonces se inhibe la migración, y las células normales se adhieren entre sí, formando un conjunto ordenado en la superficie de la placa **(Fig. 19.8)**. Las células tumorales, en cambio, continúan moviéndose tras contactar con otras, migrando sobre células adyacentes, y creciendo en patrones multicapa desordenados.

Una diferencia relacionada entre células normales y cancerosas es que muchas de estas últimas son capaces de crecer en ausencia de los factores de crecimiento necesarios para las células normales, lo que contribuye a la proliferación descontrolada de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*. En algunos casos, las células cancerosas producen factores de crecimiento que estimulan

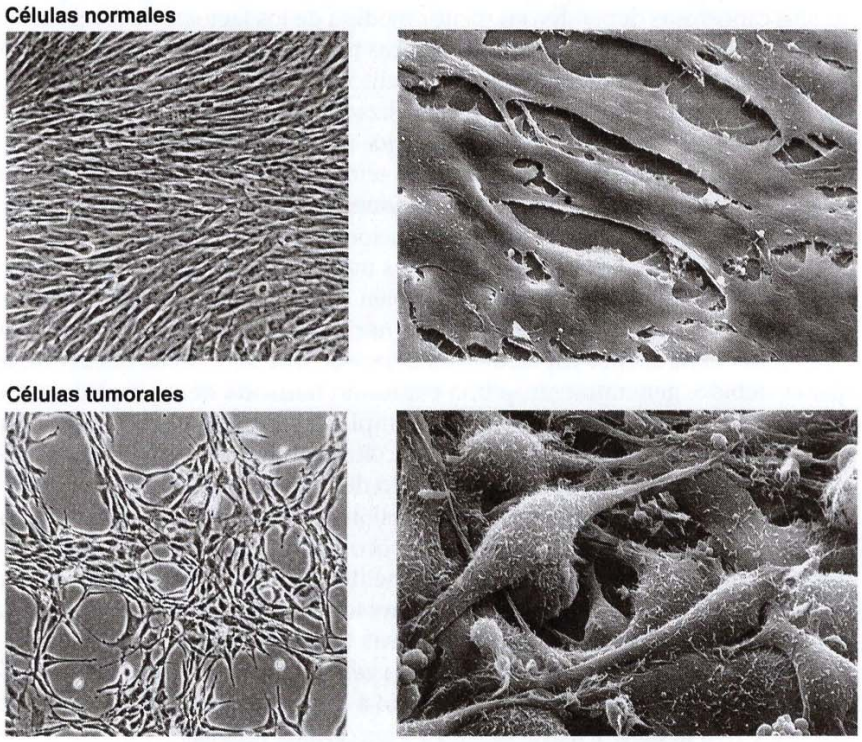


FIGURA 19.8 Inhibición por contacto. Micrografías al microscopio óptico (izquierda) y al microscopio electrónico de barrido (derecha), de fibroblastos normales y de células tumorales. La migración de los fibroblastos normales se inhibe mediante el contacto celular, por lo que se disponen ordenadamente, lado junto a lado, en la superficie de la placa de cultivo. Sin embargo, las células tumorales no se inhiben por contacto celular, por lo que migran unas sobre otras y se disponen de una manera desordenada formando una estructura en varias capas. (Cortesía de Lan Bo Chen, Dana-Farber Cancer Institute.)

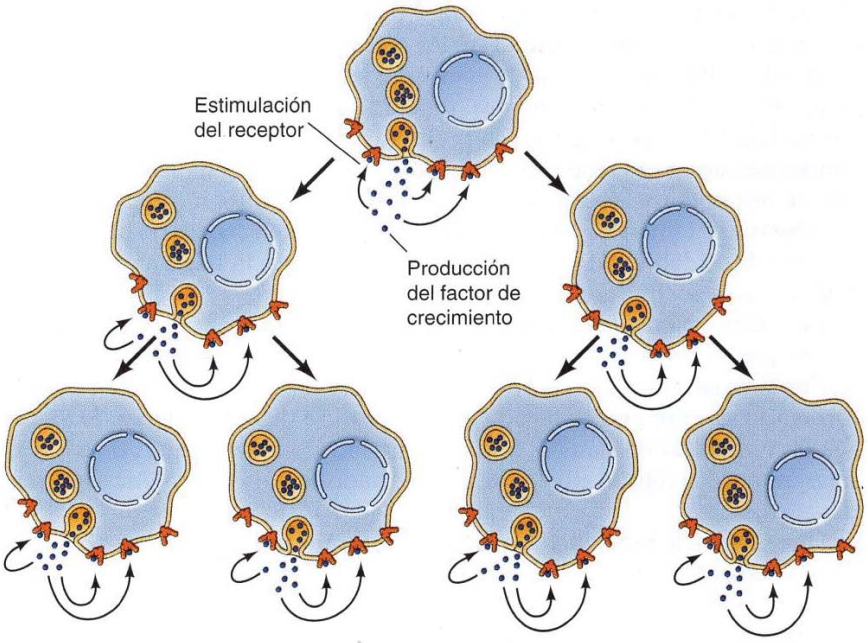


FIGURA 19.9 Estimulación autocrina del crecimiento. Una célula produce un factor de crecimiento frente al cual también responde, lo que origina la estimulación continua de la proliferación celular.

su propia proliferación (**Fig. 19.9**). Esta producción anormal de un factor de crecimiento por parte de la célula conduce a la autoestimulación continua de la división celular (**estimulación autocrina del crecimiento**), por lo que las células cancerosas dependen en menor medida de los factores de crecimiento que provengan de otras fuentes fisiológicas normales. En otras ocasiones, las células cancerosas tienen un requerimiento reducido de factores de crecimiento debido a que los sistemas de señalización intracelular están alterados; es decir, no está regulada la actividad de los receptores de los factores de crecimiento o la de otras proteínas (p. ej., proteínas Ras o proteína quinasas) que se trataron en el Capítulo 16 como componentes de las vías de transducción de las señales que conducen a la proliferación celular.

La regulación de las células cancerosas mediante las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, también se produce de una manera menos rigurosa que en el caso de las células normales. La mayoría de las células cancerosas tiene menos capacidad de adhesión que las células normales, lo que es debido, generalmente, a una expresión reducida de las moléculas de adhesión de la superficie celular. Por ejemplo, la pérdida de la E-cadherina, la molécula de adhesión principal de las células epiteliales (véase Fig. 15.25), es un factor importante para el desarrollo de carcinomas (cánceres epiteliales). Debido a que las moléculas de adhesión celular tienen un bajo nivel de expresión, las células cancerosas están poco restringidas por las interacciones con otras células y con otros componentes tisulares, lo que proporciona a las células malignas la capacidad de invadir y dar lugar a metástasis. La poca adhesividad de las células cancerosas también da lugar a alteraciones morfológicas y del citoesqueleto: muchas células tumorales son más redondeadas que las normales, en parte debido a que no se unen de una manera tan firme ni a la matriz extracelular ni a las células vecinas.

Otras dos propiedades de las células cancerosas afectan a su integración con otros componentes tisulares, por lo que desempeñan un papel importante en la invasión y en la metástasis. En primer lugar, las células transformadas suelen secretar proteasas que digieren los componentes de la matriz extracelular, lo que permite a las células cancerosas invadir los tejidos normales adyacentes. Por ejemplo, la secreción de proteasas que degradan colágeno parece ser un factor importante en la capacidad de los carcinomas de

digerir y penetrar a través de la lámina basal invadiendo el tejido conectivo subyacente (véase Fig. 19.5). En segundo lugar, las células cancerosas secretan factores de crecimiento que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (**angiogénesis**). La angiogénesis es necesaria para mantener el crecimiento de un tumor por encima de un tamaño de un millón de células, punto en el que se requieren nuevos vasos sanguíneos para proporcionar oxígeno y nutrientes a las células tumorales en proliferación. Estos vasos sanguíneos se forman en respuesta a factores de crecimiento secretados por las células tumorales; éstos estimulan la proliferación de las células endoteliales de las paredes de los capilares en el tejido contiguo, lo que origina la extensión de nuevos capilares en el tumor (véase Fig. 18.15). La formación de estos nuevos vasos sanguíneos es importante no sólo para mantener el crecimiento del tumor, sino también en la metástasis. Las células tumorales pueden penetrar fácilmente en los nuevos capilares formados en respuesta a la estimulación angiogénica, lo que proporciona una nueva oportunidad para que las células cancerosas entren en el sistema circulatorio y comience el proceso de metástasis.

Otra característica general de la mayoría de las células cancerosas es que no se diferencian de manera normal. Esta diferenciación defectuosa se asocia a la proliferación anormal, puesto que, como ya se discutió en el Capítulo 18, la mayoría de las células diferenciadas o se dividen con muy poca frecuencia o no se dividen. Las células cancerosas en vez de llevar a cabo su programa de diferenciación normal, se bloquean en un estado temprano de diferenciación, lo que concuerda con su proliferación activa continua.

Las leucemias proporcionan un ejemplo particularmente bueno de la relación entre una diferenciación defectuosa y la característica de malignidad de estas células. Todos los tipos diferentes de células sanguíneas se derivan de una célula madre común de la médula ósea (véase Fig. 18.18). Los descendientes de estas células están determinados a seguir vías de diferenciación específicas. Por ejemplo, algunas células se diferencian para formar eritrocitos mientras que otras se diferencian para formar linfocitos, granulocitos o macrófagos. Las células progenitoras de cada uno de estos tipos sufren varias rondas de división a medida que se diferencian, pero una vez que se han diferenciado por completo, cesa la división celular. Por el contrario, las células leucémicas son incapaces de sufrir la diferenciación terminal (**Fig. 19.10**). En vez de ello, se detienen en los estadios tempranos de maduración manteniendo su capacidad de proliferación y siguen reproduciéndose.

Es posible que la proliferación de una subpoblación de células progenitoras de cáncer, en mayor

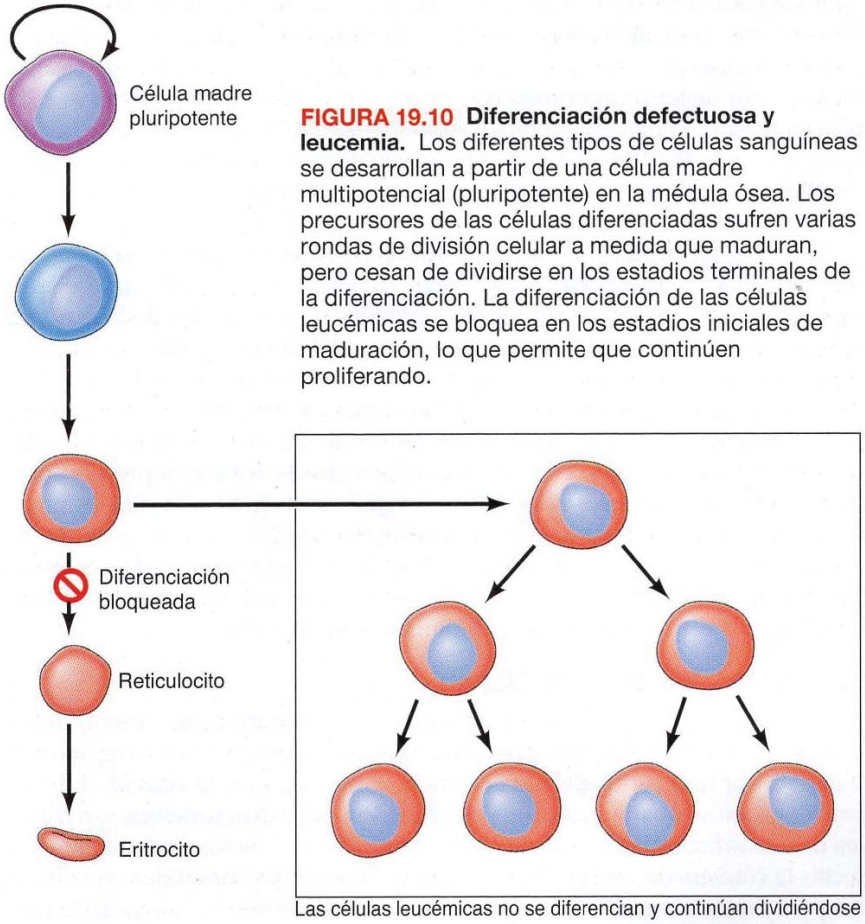


FIGURA 19.10 Diferenciación defectuosa y leucemia. Los diferentes tipos de células sanguíneas se desarrollan a partir de una célula madre multipotencial (pluripotente) en la médula ósea. Los precursores de las células diferenciadas sufren varias rondas de división celular a medida que maduran, pero cesan de dividirse en los estadios terminales de la diferenciación. La diferenciación de las células leucémicas se bloquea en los estadios iniciales de maduración, lo que permite que continúen proliferando.

medida que la proliferación continuada de todas las células tumorales, dirija el crecimiento de las leucemias y, posiblemente, algunos tumores sólidos. En este modelo, las células progenitoras del cáncer (al igual que las células progenitoras de los tejidos adultos normales; véase Fig. 18.17) se dividen para dar lugar a otras células progenitoras y a células tumorales diferenciadas que carecen de la capacidad de autoproliferación continua. Un ejemplo evidente de lo anterior es la leucemia mieloide crónica, la cual se debe a la transformación oncogénica de las células madre hematopoyéticas, que a continuación se transforman en células leucémicas diferenciadas de linajes mieloides y linfoides. De igual modo, se han obtenido indicios sobre la existencia de células progenitoras del cáncer en otras leucemias y tumores sólidos, aunque aún no se ha definido cuál sería la contribución de estas células en el crecimiento de la mayoría de los tumores.

Como ya se trató en el Capítulo 18, la **muerte celular programada** o **apoptosis** es un componente del programa de diferenciación de muchos tipos celulares, incluyendo las células sanguíneas. Muchas células cancerosas no sufren apoptosis, por lo que tienen ciclos vitales más largos en comparación con las células normales. Esta incapacidad de las células cancerosas de sufrir la muerte celular programada contribuye de una manera sustancial al desarrollo del tumor. Por ejemplo, la supervivencia de muchas células normales depende de las señales generadas por factores de crecimiento o por la matriz extracelular, que evitan la apoptosis. Sin embargo, las células tumorales pueden ser capaces de sobrevivir en ausencia de estos factores de crecimiento requeridos por las células normales. Esta incapacidad de las células tumorales de sufrir apoptosis cuando se les priva de las señales ambientales normales puede ser importante no solamente para el desarrollo del tumor primario, sino también para la supervivencia y el crecimiento de las células metastásicas en otros tejidos. Las células normales también sufren apoptosis tras la lesión del ADN, mientras que esto no les sucede a las células cancerosas. En este caso, la incapacidad de sufrir apoptosis contribuye a que las células cancerosas sean resistentes a la radiación y a muchas drogas quimioterapéuticas, que actúan dañando el ADN. Por tanto, la supervivencia celular anómala así como la proliferación celular, desempeñan un papel fundamental en el crecimiento inexorable de las células cancerosas en el animal.

La continua proliferación de células cancerosas requiere también que mantengan de manera eficaz los extremos de sus cromosomas, que se pierde durante la división de las células normales. Los extremos de los cromosomas de eucariotas (telómeros) consisten en secuencias repetidas que son replicadas por una enzima especial llamada telomerasa (véase Fig. 7.16). Las células normales contienen sólo la cantidad suficiente de telomerasa para mantener los extremos de sus cromosomas durante un número limitado de divisiones. Como consecuencia, las células normales pierden gradualmente sus telómeros al dividirse, lo que conduce al cese de la replicación (senescencia) o muerte celular. En cambio, las células cancerosas suelen adquirir la capacidad de replicarse de forma ilimitada debido a la expresión de altos niveles de telomerasa, con lo cual mantienen los extremos de sus cromosomas durante un número indefinido de divisiones.

Transformación de las células en cultivo

Para poder estudiar la inducción de tumores por radiación, agentes químicos o virus se requieren sistemas experimentales en los que se puedan reproducir y cuantificar los efectos del agente carcinógeno. Aunque la actividad de los carcinógenos se pueda probar en los animales, estos experimentos son difíciles de cuantificar y de controlar. El desarrollo de los ensayos *in vitro* para detectar la conversión de las células normales en células tumorales en cultivo, un proceso denominado **transformación celular**, representó un avance fun-

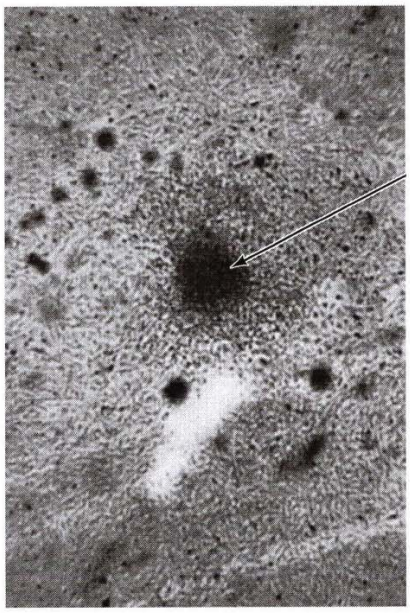


FIGURA 19.11 Ensayo focal. Un foco de fibroblastos de embrión de pollo *(flecha)* inducido por el virus del sarcoma de Rous. (A partir de H.M. Temin y H. Rubin, 1958. *Virology* 6: 669.)

damental en la investigación del cáncer. Estos ensayos se diseñan para detectar células transformadas, que muestran las características de crecimiento *in vitro* de las células tumorales, tras la exposición de un cultivo de células normales a un agente carcinógeno. Su aplicación ha permitido alcanzar un nivel de complejidad tal en el análisis de la transformación celular que no se hubiera alcanzado simplemente mediante los estudios en animales.

El primer ensayo de transformación celular y el más ampliamente utilizado es el ensayo focal, que lo desarrollaron Howard Temin y Harry Rubin en 1958. El ensayo focal se basa en la capacidad de reconocer un grupo de células transformadas como un «foco» diferenciado morfológicamente frente a un fondo de células normales en la superficie de una placa de cultivo (**Fig. 19.11**). El ensayo de foco aprovecha la morfología alterada de las células cancerosas, así como la pérdida de la inhibición dependiente de la densidad y por contacto. El resultado es que se forma una colonia de células transformadas, morfológicamente alteradas, que crecen por encima de un fondo de células normales en el cultivo. Estos focos de células transformadas pueden detectarse y cuantificarse en una semana o dos tras la exposición a un agente carcinógeno. En general, las células transformadas *in vitro* son capaces de generar tumores tras su inoculación en animales, lo que confirma a la transformación *in vitro* como un indicador válido de la formación de células cancerosas.

Virus tumorales

Los miembros de seis familias diferentes de virus animales, denominados **virus tumorales**, son capaces de causar cáncer directamente tanto en animales de experimentación como en humanos (**Tabla 19.2**). Los virus que causan cáncer en humanos incluyen los virus de la hepatitis B y C (cáncer hepático), los papilomavirus (cáncer cervical y otros anogenitales), poliomavirus de las células de Merkel (carcinoma de células de Merkel), herpesvirus como el virus de Epstein-Barr (linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo), y herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (sarcoma de Kaposi), además de retrovirus tales como el virus linfotropo de los linfocitos T humanos (leucemia de linfocitos T del adulto). Adicionalmente, el VIH es indirectamente responsable de los cánceres que se desarrollan en pacientes de SIDA como consecuencia de la inmunodeficiencia.

Como ya se comentó, los virus tumorales no sólo son causas importantes de enfermedades humanas sino que también han desempeñado un papel crítico en la investigación del cáncer al servir como modelos para los estudios celulares y moleculares de la transformación celular. El pequeño tama-

TABLA 19.2 Virus tumorales

Familia de virus	Tumores humanos	Tamaño del genoma (kb)
Virus de ADN tumorales		
Virus de la hepatitis B	Cáncer de hígado	3
Poliomavirus y SV40	Carcinoma de células de Merkel	5
Papilomavirus	Carcinoma cervical	8
Adenovirus	Ninguno	35
Herpesvirus	Linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, sarcoma de Kaposi	100–200
Virus de ARN tumorales		
Virus de la hepatitis C	Cáncer de hígado	10
Retrovirus	Leucemia de las células T de adultos	9–10

ño de sus genomas ha hecho que los virus tumorales se puedan analizar molecularmente, lo que ha permitido identificar genes virales responsables de la inducción del cáncer, y lo que ha facilitado nuestra comprensión actual del cáncer a nivel molecular.

Virus de la hepatitis B y C

Los virus de la **hepatitis B** y **C** son los principales causantes del cáncer hepático, que es la tercera causa de muertes por cáncer en el mundo. Los virus de la hepatitis B y C infectan específicamente células hepáticas y pueden dar lugar a infecciones crónicas del hígado de larga duración. Dichas infecciones crónicas están asociadas con un alto riesgo de padecer un cáncer hepático, que finalmente se desarrolla en un 10%-20% de las personas con infecciones crónicas por hepatitis B y en un 5 % de las personas crónicamente infectadas con la hepatitis C.

Los mecanismos moleculares por los que los virus de la hepatitis causan el cáncer hepático todavía son desconocidos. La hepatitis B es un virus ADN con un genoma de tan solo 3 kb. La transformación celular por el virus de la hepatitis B puede estar mediada por una proteína (denominada HBx) que inhibe la proteína supresora tumoral p53 y que afecta a la expresión de varios genes celulares que dirigen la proliferación celular. Adicionalmente, el desarrollo de los cánceres inducidos por el virus de la hepatitis B está dirigido por la proliferación continua de las células hepáticas que resulta del daño e inflamación tisular crónicos. La hepatitis C es un virus ARN con un genoma de aproximadamente 10 kb. La proliferación celular en respuesta a una inflamación crónica es una de las principales contribuciones al desarrollo de cáncer en personas crónicamente infectadas por el virus de la hepatitis C, a pesar de que también es posible que algunas proteínas del virus de la hepatitis C estimulen directamente la proliferación de las células hepáticas infectadas.

Virus tumorales de ADN pequeño

Los virus tumorales de ADN pequeño comprenden varias familias de virus (**poliomavirus, papilomavirus** y **adenovirus**) cuyos genomas suman de 5 a 35 kb. Los **papilomavirus** son causas importantes de cáncer humano. Se han identificado cerca de 150 tipos diferentes de papilomavirus humanos, que infectan células epiteliales de varios tejidos. Algunos de estos virus solo provocan tumores benignos (p. ej., verrugas), mientras que otros causan carcinomas malignos, especialmente del cuello uterino y otros cánceres anogenitales. La mortalidad del cáncer de cérvix es relativamente baja en EE. UU., en gran medida a resultas de la detección precoz y el tratamiento curativo posibilitados por la técnica de Papanicolaou. Las vacunas frente a los tipos más frecuentes de papilomavirus humanos también son eficaces para prevenir el cáncer de cérvix. En otras partes del mundo, sin embargo, el cáncer de cuello uterino sigue siendo frecuente; es el segundo más frecuente en las mujeres y el responsable del 5-10% de la incidencia de cáncer mundial.

El último virus tumoral humano descrito es el **poliomavirus de las células de Merkel**, identificado en 2008 como causa de un cáncer de piel infrecuente, el carcinoma de células de Merkel. Otros poliomavirus, SV40, y los adenovirus no se asocian con cáncer humano, pero sí han sido muy importantes como modelos para conocer la base molecular de la transformación celular. La utilidad de estos virus en la investigación del cáncer se debe a la existencia de buenos ensayos de cultivos celulares para la replicación del virus y la transformación, así como al pequeño tamaño de sus genomas.

La mayoría de los poliomavirus, SV40 y los adenovirus no inducen tumores ni transforman las células de sus especies huésped naturales en las que se replican. Más bien, la replicación vírica da lugar a la lisis celular y li-

◆ La prueba de Pap fue desarrollada por George Papanicolaou en los años 1930. Se recogen células uterinas y se realiza un frotis sobre un portaobjetos. Puesto que las células cancerosas poseen una morfología alterada pueden detectarse fácilmente mediante el examen microscópico.

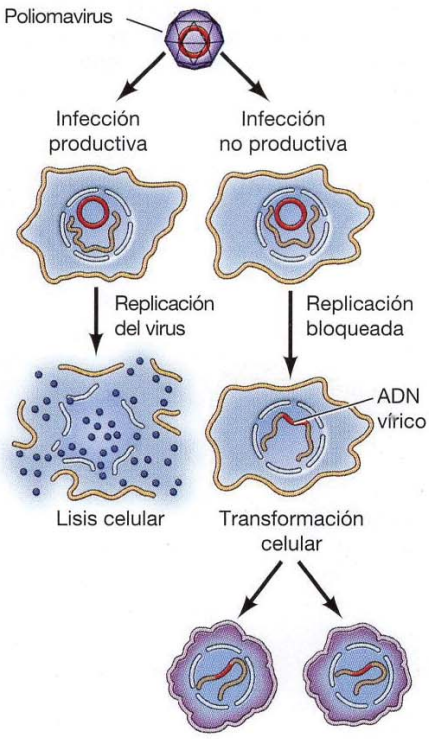


FIGURA 19.12 Replicación del poliomavirus y transformación. La infección productiva resulta en replicación del virus, lisis celular, y salida de las partículas víricas hijas. En una infección no productiva, la replicación vírica está bloqueada, y algunas porciones del ADN vírico pueden integrarse entonces en el genoma del huésped, conduciendo a la transformación celular.

beración de las partículas víricas hijas (**Fig. 19.12**). Como la célula muere a consecuencia de la replicación del virus, no puede ser transformada. El potencial transformador de estos virus se pone de manifiesto, no obstante, con la infección de una célula en la que está bloqueada la replicación vírica. Esto puede suceder si la célula carece de los factores del huésped necesarios para la replicación del virus, o si el genoma vírico se integra en el ADN celular en vez de replicarse. En estas circunstancias de infección no productiva, la expresión de genes víricos específicos da lugar a la transformación de la célula infectada.

Los genes víricos causantes de la transformación celular son los mismos que intervienen en las primeras fases de la infección lítica (que conduce a lisis celular). Los genomas de los virus tumorales de ADN pequeños se dividen en regiones iniciales y tardías. La región inicial se expresa inmediatamente después de la infección y es necesaria para la síntesis del ADN vírico. La región tardía no se expresa hasta que ha comenzado la replicación del ADN vírico y contiene genes que codifican componentes estructurales de la partícula vírica. En la infección lítica, estas proteínas de la región inicial desarrollan múltiples funciones necesarias para la replicación del virus, como estimular la expresión génica de la célula huésped y la síntesis del ADN. Como la replicación vírica depende de las enzimas de la célula huésped (p. ej., ADN-polimerasa), esa estimulación de la célula huésped es un punto crítico en el ciclo vital del virus. Como se trató en el Capítulo 18, la mayoría de las células de un animal no son proliferantes, y por tanto deben ser estimuladas para dividirse con el fin de inducir las enzimas necesarias en la replicación del ADN vírico. Esta estimulación de la proliferación celular por parte de los productos de los genes iniciales puede dar lugar a la transformación si el ADN vírico se integra de forma estable y se expresa en una célula en la que está bloqueada la replicación del virus.

Las proteínas de la región inicial de los virus de ADN pequeño inducen la transformación interaccionando con proteínas del huésped que regulan la proliferación celular. Por ejemplo, la transformación celular debida a los papilomavirus humanos resulta de la expresión de dos genes de la región inicial, *E6* y *E7* (**Fig. 19.13**). Las proteínas E6 y E7 se unen e inactivan las proteínas supresoras de tumores p53y Rb de la célula huésped, que son reguladores esenciales de la proliferación y supervivencia celular. Concretamente, la E6 estimula la degradación de p53 por proteólisis medida por ubicuitina, y E7 inhibe a Rb. Del mismo modo, las proteínas transformadoras de SV40 y los adenovirus tienen como objetivo p53 y Rb, lo que indica que la inactivación de estos supresores es crucial en la transformación celular.

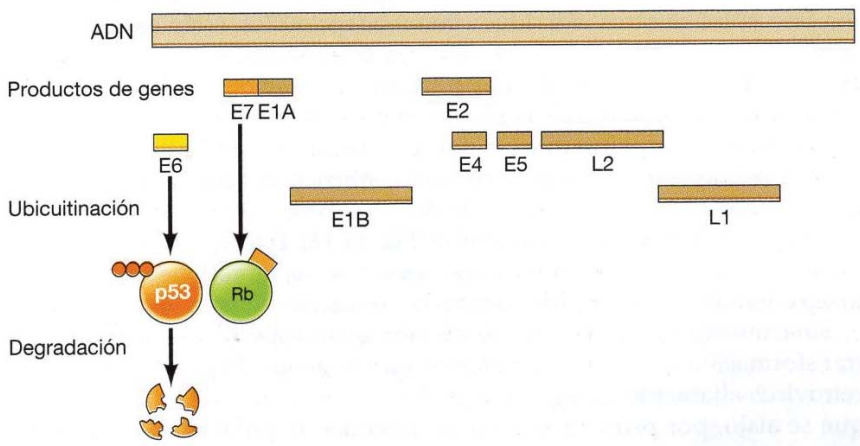


FIGURA 19.13 Genoma de un papilomavirus humano. Los productos génicos se designan como E (*early*-tempranos) y L (*late*-tardíos). La transformación se debe a la acción de E6 y de E7. E6 estimula la ubicuitilación y degradación de p53, y E7 inhibe a Rb.

Herpesvirus

Los **herpesvirus** se encuentran entre los virus animales más complejos, con genomas de 100 a 200 kb. Varios herpesvirus inducen tumores en especies animales, entre las que se incluyen ranas, pollos y monos. Además, dos miembros de la familia de los herpesvirus, el **herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi** y el **virus de Epstein-Barr**, son causantes de cánceres humanos. El herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi desempeña un papel crítico en el desarrollo del sarcoma de Kaposi, y el virus de Epstein-Barr se ha relacionado con varios cánceres humanos, entre los que se incluyen el linfoma de Burkitt en algunas regiones de África, los linfomas de células B en pacientes con sida y otros individuos inmunodeprimidos, y el carcinoma nasofaríngeo en China.

Además de su asociación con estos cánceres humanos, el virus de Epstein-Barr es capaz de transformar linfocitos B humanos en cultivo. Sin embargo, debido en parte a la complejidad de su genoma, la biología molecular de la replicación y de la transformación del virus de Epstein-Barr todavía no se ha comprendido en su totalidad. La principal proteína transformante del virus de Epstein-Barr (LMP1) imita a un receptor de superficie celular en los linfocitos B y funciona activando las vías de señalización que estimulan la proliferación celular e inhiben la apoptosis. Otros varios genes víricos pueden también contribuir a la transformación de linfocitos, pero sus funciones en el proceso de transformación no han sido establecidas.

El herpesvirus de ADN asociado al sarcoma de Kaposi se encuentra regularmente en células del sarcoma de Kaposi, y en estos tumores. Una característica importante de las células del sarcoma de Kaposi es que secretan una diversidad de citoquinas y factores de crecimiento que dirigen el desarrollo tumoral. Curiosamente, las proteínas transformantes del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi parecen actuar al menos en parte estimulando la secreción de factores de crecimiento.

◆ Denis Burkitt era cirujano en Uganda cuando encontró varios casos de pacientes con tumores de cabeza y cuello, e identificó la enfermedad como un linfoma no descrito hasta el momento. Michael Epstein e Ivonne Barr posteriormente aislaron un virus a partir de tejido de linfoma de Burkitt, proporcionando una de las primeras asociaciones entre los virus y el cáncer humano.

Retrovirus

Los **retrovirus** causan cáncer en una diversidad de especies animales, incluyendo al hombre. Un retrovirus humano, el virus tipo 1 linfotrópico humano de células T (HTLV-1), es el agente causante de la leucemia de células T de adultos, que es frecuente en partes de Japón, el Caribe y África. La transformación de los linfocitos T por el HTLV-1 se debe a la expresión del gen vírico *tax*, que codifica una proteína reguladora que afecta a la expresión de varios genes que controlan el crecimiento celular. El sida está causado por otro retrovirus, el IV. A diferencia del HTLV-1, el IV no causa cáncer de manera directa convirtiendo una célula normal en una célula tumoral. Sin embargo, los pacientes de sida sufren una elevada incidencia de algunos cánceres, particularmente linfomas y el sarcoma de Kaposi. Estos cánceres, que también son frecuentes en otros individuos inmunodeprimidos, están asociados con la infección por otros virus (p. ej., el virus de Epstein-Barr y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi), y parece ser que se desarrollan como una consecuencia secundaria de la inmunosupresión en los pacientes con sida.

Los distintos retrovirus difieren de manera sustancial en su potencial oncogénico. La mayoría de los retrovirus sólo contienen tres genes (*gag*, *pol* y *env*) que son necesarios para la replicación del virus, pero que no desempeñan ningún papel en la transformación celular (**Fig. 19.14**). Este tipo de retrovirus raramente induce tumores como consecuencia de las mutaciones debidas a la integración del ADN provírico dentro de los genes celulares, o junto a éstos.

Sin embargo, otros retrovirus contienen genes específicos que inducen la transformación celular y son potentes carcinógenos. El prototipo de estos retrovirus altamente oncogénicos es el **virus del sarcoma de Rous (RSV)**, que se aisló, por primera vez, en un sarcoma de pollo por Peyton Rous

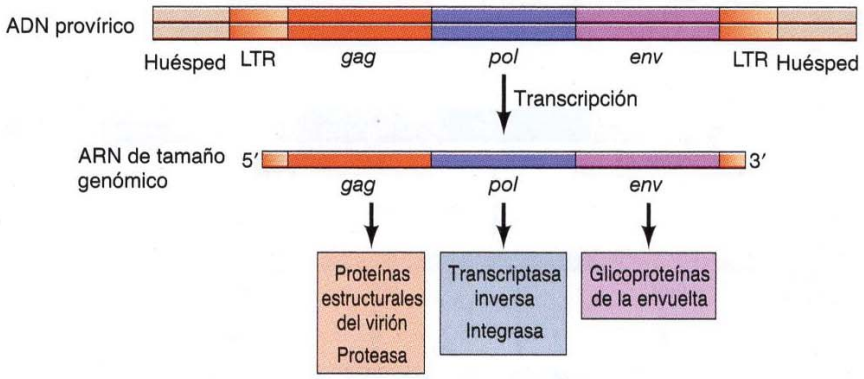


FIGURA 19.14 Genoma de un retrovirus típico. El ADN provírico integrado en el ADN celular se transcribe para dar lugar a un ARN de tamaño genómico. Este tránscrito primario servirá como ARN genómico de las nuevas partículas víricas, y como ARN mensajero de los genes *pol* y *gag*. Además, el ARN se corta y empalma para dar lugar al ARNm de *env*. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales de las partículas víricas y la proteasa viral, *pol* codifica la transcriptasa inversa y la integrasa, y *env* codifica las glicoproteínas de la envuelta.

en 1911. Más de 50 años después, los estudios sobre el RSV condujeron a la identificación del primer oncogén vírico, lo que ha proporcionado un modelo para comprender muchas características del desarrollo de los tumores a nivel molecular.

Oncogenes

El cáncer se debe a las alteraciones en determinados genes reguladores que controlan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Los estudios sobre los virus tumorales revelaron que unos genes específicos (denominados **oncogenes**) eran capaces de inducir la transformación celular, lo que proporcionó una primera aproximación a las bases moleculares del cáncer. Sin embargo, la mayoría de los cánceres humanos (aproximadamente el 80%) no son inducidos por virus y surgen debido a otras causas, como la radiación y los carcinógenos químicos. Por tanto, para una comprensión completa del cáncer, ha sido fundamental que los estudios sobre los oncogenes víricos condujeran a la identificación de los oncogenes celulares, que están implicados en el desarrollo de aquellos cánceres no inducidos por virus. El nexo entre los oncogenes víricos y los celulares lo proporcionaron los estudios sobre los retrovirus altamente oncogénicos.

Oncogenes retrovíricos

Los oncogenes víricos se definieron por primera vez en el RSV, que transforma a los fibroblastos de embrión de pollo en cultivo e induce grandes sarcomas una o dos semanas después de haber sido inoculado en pollos (**Fig. 19.15**). Por el contrario, el virus de la leucosis aviar (ALV), que está emparentado con el anterior, se replica en las mismas células que el RSV pero no induce su transformación. Esta diferencia en el potencial transformador sugería que el RSV podía contener información genética específica responsable de la transformación de las células infectadas. Una comparación directa de los genomas del RSV y del ALV apoyaba esta hipótesis: el ARN genómico del RSV tenía cerca de 10 kb, mientras que el del ALV era más pequeño, aproximadamente 8,5 kb.

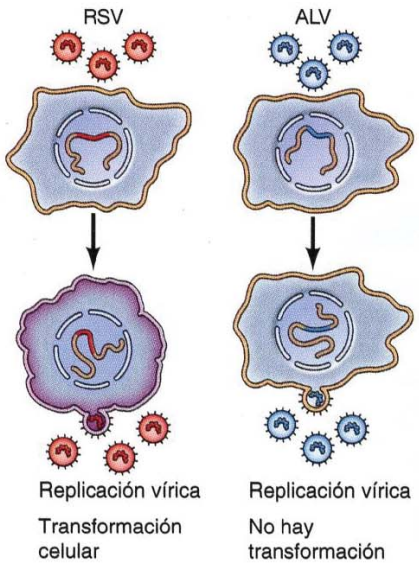


FIGURA 19.15 Transformación celular por el RSV y por el ALV. Tanto el RSV como el ALV infectan y se replican en los fibroblastos de embrión de pollo, pero sólo el RSV induce la transformación celular.

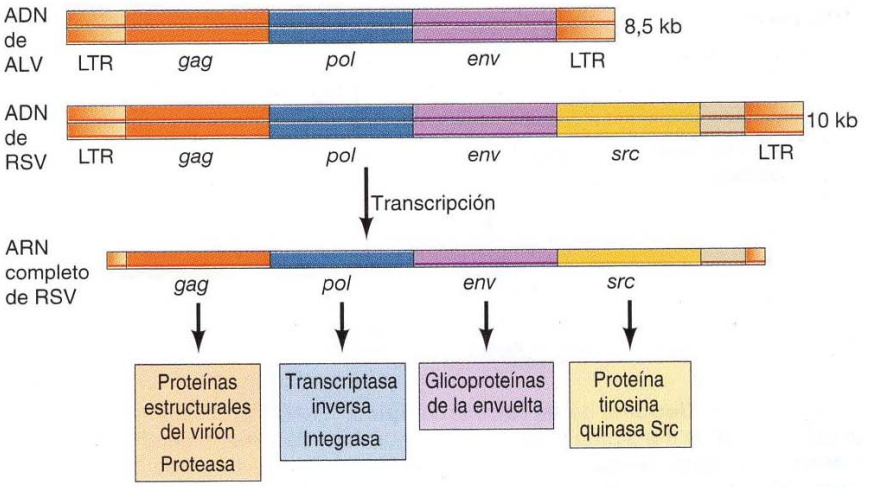


FIGURA 19.16 Genomas de RSV y ALV. El RSV contiene un gen adicional, *src* (ausente en ALV), que codifica la proteína tirosina quinasa Src. Los otros tres genes del retrovirus (*gag*, *pol* y *env*, véase Fig. 19.14) son necesarios para la replicación pero no participan en la transformación celular.

A principios de los años 70, Peter Vogt y Steven Martin aislaron mutantes de deleción y mutantes sensibles a la temperatura del RSV, que eran incapaces de inducir la transformación. Sin embargo, estos mutantes se podían replicar normalmente en las células infectadas, lo que indica que el RSV contiene información genética necesaria para la transformación pero no para la replicación del virus. A partir del análisis de los mutantes de deleción y de los mutantes sensibles a la temperatura se caracterizó un único gen responsable de la capacidad del RSV de inducir tumores en aves y de transformar los fibroblastos en cultivo. Puesto que el RSV provoca *sarc*omas, su oncogén se denominó ***src***. El gen *src* es un añadido al genoma del RSV; no está presente en el ALV (**Fig. 19.16**). Codifica una proteína de 60 kDa que fue la primera tirosina quinasa identificada (véase experimento clave en el Cap. 9).

Se han aislado más de 40 retrovirus diferentes altamente oncogénicos, a partir de varios animales, incluyendo pollos, pavos, ratones, ratas, gatos y monos. Todos estos virus, al igual que el RSV, contienen al menos un oncogén (en algunos casos dos) que no es necesario para la replicación del virus pero que es el responsable de la transformación celular. En algunos casos, virus diferentes contienen los mismos oncogenes, pero se han identificado más de dos docenas de oncogenes distintos en estos virus (**Tabla 19.3**). Al igual que *src*, muchos de estos genes (como por ejemplo ***ras*** y ***raf***) codifican proteínas que ahora se sabe que son componentes de las vías de señalización que activan la proliferación celular (véase Fig. 16.28).

TABLA 19.3 Oncogenes representativos retrovirales

Oncogén	Virus	Especie
abl	Leucemia de Abelson	Ratón
akt	Virus AKT8	Ratón
erbA	Eritroblastosis aviar ES4	Pollo
erbB	Eritroblastosis aviar ES4	Pollo
fos	Sarcoma osteogénico murino FBJ	Ratón
jun	Sarcoma aviar 17	Pollo
mos	Sarcoma de Moloney	Ratón
myc	Mielocitomatosis aviar	Pollo
p3k	Sarcoma aviar 16	Pollo
raf	Sarcoma murino 3611	Ratón
rasH	Sarcoma de Harvey	Rata
rasK	Sarcoma de Kirsten	Rata
rel	Reticuloendoteliosis	Pavo
sis	Sarcoma de simio	Mono
src	Sarcoma de Rous	Pollo

Proto-oncogenes

Una característica inesperada de los oncogenes retrovíricos es que no están involucrados en la replicación del virus. Puesto que la mayoría de los virus están diseñados para replicarse de la manera más eficaz posible, la existencia de oncogenes virales que no son una parte integrante del ciclo vital del virus, supone una paradoja. Por tanto, los científicos se vieron obligados a preguntarse de dónde procedían los oncogenes retrovíricos y cómo se habían incorporado a los genomas virales —una línea de investigación que permitió identificar los oncogenes celulares en los cánceres humanos.

La primera pista acerca del origen de los oncogenes la proporcionó la manera de aislar los virus altamente oncogénicos. El aislamiento del virus de la leucemia de Abelson es un ejemplo típico (**Fig. 19.17**). Se inocularon más de 150 ratones con un virus no transformante que contenía solamente los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la replicación del virus. Uno de estos ratones desarrolló un linfoma a partir del cual se aisló un nuevo virus altamente oncogénico (el virus de la leucemia de Abelson), que ahora contenía un oncogén (*abl*). Se sugirió la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos procedían de genes de la célula huésped. Un gen de la célula huésped que puede activar la proliferación celular se incorpora de forma ocasional en un genoma vírico, lo que produce un virus nuevo y altamente oncogénico derivado de la célula huésped.

La propuesta clave de esta hipótesis era que las células normales contenían genes que estaban relacionados con los oncogenes retrovíricos. Esto se demostró definitivamente en 1976 por Harold Varmus, J. Michael Bishop y cols., que demostraron que una sonda de ADNc para el oncogén *src* del SRV hibridaba con secuencias relacionadas en el ADN de células normales de pollo. Más aún, se encontraron secuencias relacionadas con *src* en los ADN normales de un amplio grupo de vertebrados (incluidos los humanos), por lo que parecía que se habían conservado en la evolución. Experimentos similares con sondas para los oncogenes de otros retrovirus altamente oncogénicos han dado resultados similares, y actualmente está establecido que los oncogenes retrovíricos derivan de genes similares de células normales.

Los genes de las células normales a partir de los cuales se originan los oncogenes retrovíricos se denominan **proto-oncogenes**. Son genes reguladores importantes ya que en muchos casos codifican proteínas que intervienen en las vías de la transducción de señales que controlan la proliferación celular normal (p. ej., *src*, *ras* y *raf*). Los oncogenes son formas de sus correspondientes proto-oncogenes que se expresan de manera anormal o que han mutado. Debido a estas alteraciones, los oncogenes inducen una proliferación celular anormal y el desarrollo del tumor.

Un oncogén que se incorpora en un genoma retrovírico difiere en varios aspectos de su correspondiente proto-oncogén. En primer lugar, el oncogén vírico se transcribe bajo el control de las secuencias promotoras y activadoras del virus, en vez de ser controlado por las secuencias reguladoras de la transcripción del proto-oncogén. Por tanto, los oncogenes se expresan en niveles

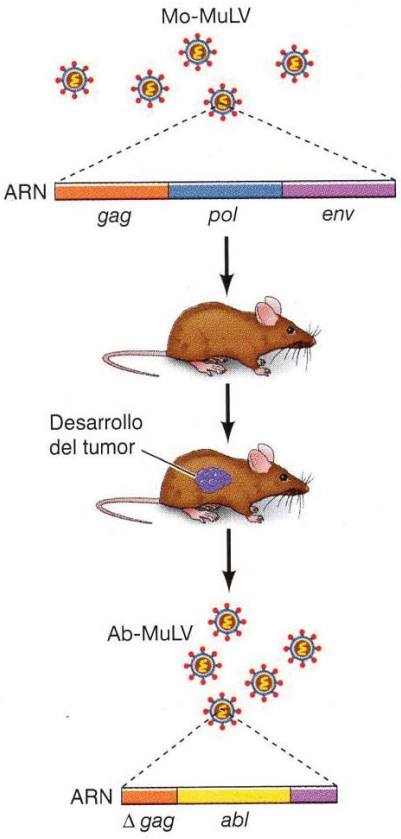
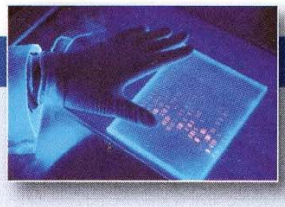


FIGURA 19.17 Aislamiento del virus de la leucemia de Abelson. El virus Ab-MuLV, que es un virus altamente oncogénico, se aisló a partir de un tumor poco habitual que se desarrolló en un ratón al que se le había inoculado un virus no transformante (el virus de la leucemia murina de Moloney, o MoMuLV). MoMuLV solo tenía los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la replicación del virus. Sin embargo, Ab-MuLV tenía un nuevo oncogén (*abl*), que era el responsable de su actividad transformante. El oncogén *abl* sustituía a algunos de los genes de la replicación del virus (*pol* y *env*) y se encontraba en el genoma de Ab-MuLV unido a un gen *gag* que tenía una deleción (se denominó Δ*gag*).



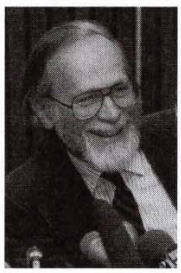
EXPERIMENTO CLAVE

Descubrimiento de los proto-oncogenes

Un ADN relacionado con el(los) gen(es) transformante(s) del virus del sarcoma aviar se encuentra en el ADN de las aves sanas

Dominique Stehelin, Harold E. Varmus, J. Michael Bishop y Peter K. Vogt
Departamento de microbiología, Universidad de California, San Francisco (DS, HEV y JMB) y Departamento de Microbiología, Universidad de California, Los Ángeles (PKV)

Nature, Volumen 260, 1976, págs. 170-173



J. Michael Bishop

Harold Varmus

Contexto

Mediante el análisis genético del RSV se determinó que el primer oncogén vírico (*src*) era un gen responsable de la transformación celular pero que no se requería para la replicación del virus. El hecho de que algunos retrovirus altamente oncogénicos se originaran a partir de los tumores de animales infectados hizo que se propusiera la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos procedían de genes similares que se encontraban en las células hospedadoras. El hecho de que, mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, se encontraran secuencias de ADN similares a las de los retrovirus en las células normales de varias especies, reafirmaba esta hipótesis. Sin embargo, no estaba claro si estas secuencias eran similares a los oncogenes retrovíricos o a los genes necesarios para la replicación.

Harold Varmus, J. Michael Bishop y cols. resolvieron este dilema aprovechando la caracterización genética del oncogén *src*. Concretamente, Peter Vogt ya había aislado mutantes de transformación defectuosa del RSV que tenían deleciones de cerca de 1,5 kb que correspondían a casi todo o a todo el gen *src*. Stehelin y cols. prepararon una sonda de ADNc para secuencias específicas de *src*. La utilización de esta sonda en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos les permitió demostrar de manera definitiva que las células normales contienen secuencias de ADN similares a *src*.

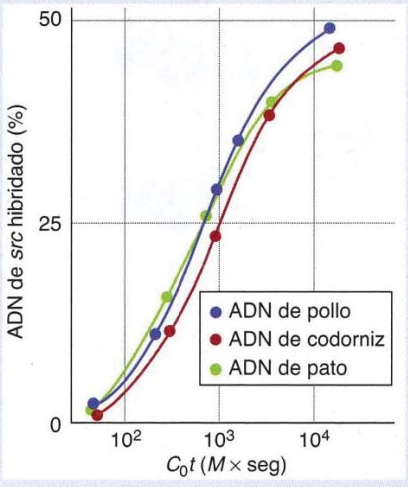
Experimento

En primer lugar, se utilizó la transcriptasa inversa para sintetizar una sonda de ADNc radiactivo, constituido por cortos fragmentos de ADN monocatenario complementarios al ARN genómico del RSV. Esta sonda se hibridó a un exceso de ARN purificado a partir de un mutante de deleción de transformación defectuosa. Los fragmentos de ADNc que eran complementarios a los genes virales de la replicación se hibridaron al ARN del RSV de transformación defectuosa, formándose moléculas de heterodúplex ARN-ADN. Por el contrario, los fragmentos de ADNc que eran complementarios a *src* no se hibridaron y permanecieron como una única cadena. Entonces se aisló este ADN monocatenario para generar una sonda específica de la secuencia oncogénica *src*. Tal y como se había predicho a través del tamaño de las deleciones en los mutantes de transformación defectuosa de RSV, la sonda específica de *src* era homóloga a un fragmento de cerca de 1,5 kb del ARN de RSV.

A continuación, el ADNc de *src* radiactivo se utilizó como una sonda de hibridación para detectar secuencias de ADN similares en células de ave normales. De manera sorprendente, el ADNc de *src* se hibridó con el ADN de pollos normales así como con el ADN de otras especies de aves (véase figura). De esta manera, estos experimentos demostraron que las células normales contenían secuencias de ADN que estaban íntimamente relacionadas con el oncogén *src*, lo que apoyaba la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos se originaban a partir de genes celulares que se incorporaban al genoma del virus.

Impacto

El artículo de Stehelin y cols. publicado en 1976 finalizaba proponiendo la posibilidad de que «las secuencias celulares *src* intervengan en la regulación del desarrollo y del crecimiento de las células normales, o en la transformación del comportamiento celular debida a agentes físicos, químicos o virales». Esta propuesta ha sido confirmada, y el descubrimiento de las secuencias celulares *src* abrió las puertas a la comprensión de la regulación de la proliferación de las células normales y de la base molecular del cáncer humano. Los estudios de las proteínas oncogénicas y proto-oncogénicas, incluyendo a la propia Src, han resultado ser fundamentales para desentrañar las vías de señalización que controlan la proliferación y diferenciación de las células normales. El descubrimiento del proto-oncogén *src* sugería aún más que los tumores no inducidos por virus se podían generar debido a mutaciones en genes celulares similares, lo que condujo directamente al descubrimiento de los oncogenes en los tumores humanos. Los resultados de Varmus, Bishop y cols. supusieron la unificación de los estudios sobre los virus tumorales, sobre las células normales y sobre los tumores no inducidos por virus; esto implica que han afectado a prácticamente todos los aspectos de la investigación sobre el cáncer y sobre la regulación celular.



Hibridación del ADNc específico de src con el ADN de pollo, codorniz y pato normales.

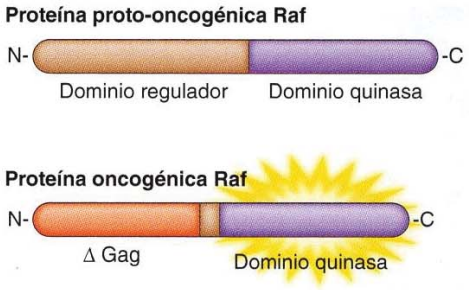


FIGURA 19.18 Proteína oncogénica Raf. La proteína proto-oncogénica Raf está constituida por un dominio regulador amino terminal y por un dominio carboxilo terminal con actividad proteína quinasa. La proteína oncogénica viral Raf carece del dominio regulador, y éste es sustituido por una secuencia de la proteína vírica Gag (Δ Gag). El resultado es que el dominio quinasa de Raf está constitutivamente activo, lo que causa la transformación celular.

mucho mayores que los proto-oncogenes y a veces se transcriben en tipos celulares que no son los adecuados. En algunos casos, esas alteraciones de la expresión génica son suficientes para convertir un proto-oncogén que funciona normalmente en un oncogén que provoca la transformación celular.

Además de estas alteraciones en la expresión génica, los oncogenes suelen codificar proteínas que difieren en estructura y función de aquéllas codificadas por sus homólogos normales. Muchos oncogenes, como *raf*, se expresan como proteínas de fusión con secuencias virales en su extremo amino terminal (**Fig. 19.18**). Los procesos de recombinación que dan lugar a estas proteínas de fusión suelen ocurrir durante la captura de los proto-oncogenes por los retrovirus, y normalmente, durante el proceso, se delecionan secuencias de los extremos amino y carboxilo terminal de los proto-oncogenes. Estas deleciones pueden causar que se pierdan los dominios reguladores que controlan la actividad de las proteínas proto-oncogénicas, dando lugar a proteínas oncogénicas cuya función no está regulada de manera hiperactiva. Por ejemplo, el oncogén vírico *raf* codifica una proteína de fusión en la que falta la secuencia amino terminal de la proteína normal Raf. Esta secuencia amino terminal es clave para la regulación normal de la actividad proteína quinasa de Raf, y su deleción da como resultado una actividad constitutiva no regulada de la proteína Raf codificada por el oncogén. Esta hiperactividad de Raf provoca la proliferación celular anormal, lo que da lugar a la transformación celular.

Muchos otros oncogenes difieren de sus correspondientes proto-oncogenes debido a mutaciones puntuales, dando lugar a la sustitución de un único aminoácido en los productos oncogénicos. En algunos casos, la consecuencia de estas sustituciones de los aminoácidos (como las deleciones ya tratadas) es que no se regule la actividad de la proteína oncogénica. Un ejemplo importante de estas mutaciones puntuales lo proporcionan los oncogenes *ras*, que se tratarán en la siguiente sección al hablar de su papel en los cánceres humanos.

Los oncogenes en el cáncer humano

Tras comprender el origen de los oncogenes retrovíricos, la siguiente cuestión era saber si los tumores que no eran inducidos por los virus contenían oncogenes celulares que se hubieran generado a partir de proto-oncogenes por mutaciones o por reordenamientos del ADN durante el desarrollo del tumor. La primera evidencia acerca del papel de los oncogenes celulares en los tumores humanos se obtuvo mediante experimentos de transferencia génica en 1981 en los laboratorios de Robert Weinberg y de Geoffrey Cooper (uno de los autores de este libro). Se encontró que el ADN de un carcinoma de vejiga humano inducía la transformación de las células en cultivo receptoras, lo que indicaba que el tumor humano contenía un oncogén celular biológicamente activo (**Fig. 19.19**). Desde entonces, mediante ensayos de transferencia génica y mediante otras técnicas experimentales

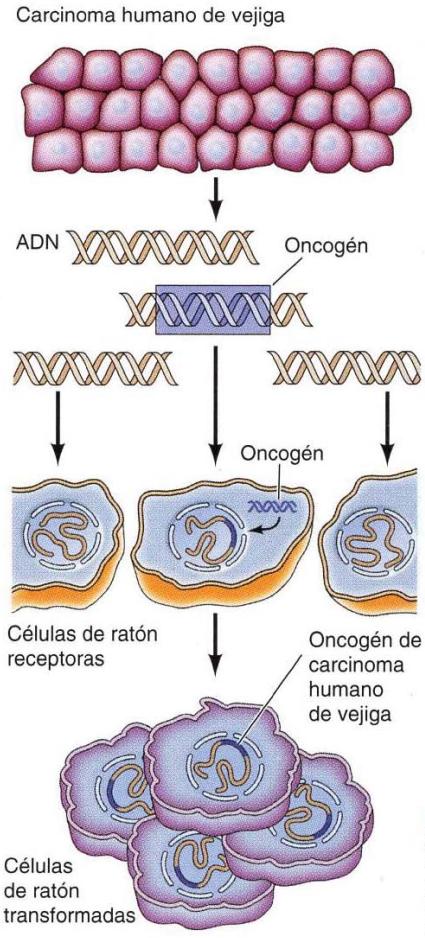


FIGURA 19.19 Detección de un oncogén de un tumor humano mediante transferencia génica. El ADN extraído de un carcinoma humano de vejiga indujo la transformación de células de ratón receptoras en cultivo. La transformación se debió a la integración y a la expresión de un oncogén procedente del tumor humano.

alternativas, se han detectado oncogenes celulares activos en diferentes tipos de tumores humanos (**Tabla 19.4**).

Algunos de los oncogenes que se han identificado en tumores humanos son homólogos celulares de los oncogenes que previamente se caracterizaron en retrovirus, mientras que otros son oncogenes nuevos que se han descubierto por primera vez en los cánceres humanos. El primer oncogén humano identificado en los ensayos de transferencia génica fue posteriormente identificado como el homólogo humano del oncogén *ras*H del virus del sarcoma de Harvey (véase Tabla 19.3). Tres miembros relacionados de la familia de los genes *ras* (*ras*H, *ras*K y *ras*N) son los oncogenes que se encuentran con mayor frecuencia en los tumores humanos. Estos genes están implicados en aproximadamente el 25% de todos los cánceres humanos, incluyendo cerca del 50% de los cánceres de colon y el 25% de los carcinomas de pulmón.

Los oncogenes *ras* surgen de los protooncogenes presentes en las células normales como resultado de mutaciones que tienen lugar durante el desarrollo tumoral. Los oncogenes *ras* difieren de sus proto-oncogenes en mutaciones puntuales cuya consecuencia es la sustitución de un único aminoácido en posiciones clave. La primera de estas mutaciones que se descubrió fue la sustitución de valina en lugar de glicina en la posición 12 (**Fig. 19.20**). También se encuentran frecuentemente en los oncogenes *ras* de tumores humanos otras sustituciones de aminoácidos en la posición 12, así como en las posiciones 13 y 61. Las mutaciones que convierten los proto-oncogenes *ras* a oncogenes son causadas por carcinógenos químicos, lo que proporciona un vínculo directo entre la acción mutagénica de los carcinógenos y la transformación celular.

TABLA 19.4 Oncogenes representativos de tumores humanos

Oncogén	Tipo de cáncer	Mecanismo de activación
abl	Leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda	Translocación
bcl-2	Linfoma folicular de células B	Translocación
CCND1	Adenoma paratifoideo, linfoma de células B	Translocación
CCND1	Carcinomas de células escamosas, vejiga, mama, esofágico, hepático y pulmonar	Amplificación
cdk4	Melanomas	Mutación puntual
CTNNB1	Carcinoma de colon	Mutación puntual
*erb*B	Gliomas, muchos carcinomas	Amplificación
*erb*B	Carcinomas de pulmón	Mutación puntual
*erb*B-2	Carcinomas de mama y de ovario	Amplificación
c-*myc*	Linfoma de Burkitt	Translocación
c-*myc*	Carcinomas de mama y pulmón	Amplificación
L-*myc*	Carcinoma pulmonar	Amplificación
N-*myc*	Neuroblastoma, carcinoma pulmonar	Amplificación
PDGFR	Leucemia mielomonocítica crónica	Translocación
PDGFR	Tumores estromales gastrointestinales	Mutación puntual
PI3K	Carcinoma de mama	Mutación puntual
	Ovario, gástrico y pulmonar	Amplificación
PML/RARα	Leucemia promielocítica aguda	Translocación
B-*raf*	Melanoma, carcinoma de colon	Mutación puntual
*ras*H	Carcinoma tiroideo	Mutación puntual
*ras*K	Carcinomas de colon, pulmón, pancreático y tiroideo	Mutación puntual
*ras*N	Leucemias mieloide aguda y linfocítica, carcinoma tiroideo	Mutación puntual

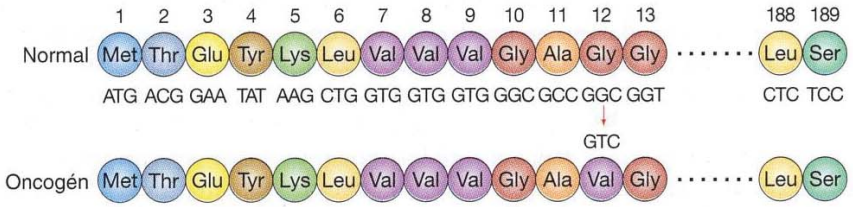


FIGURA 19.20 Mutaciones puntuales en los oncogenes *ras*. Un único cambio de nucleótidos, que hace que el codón 12 cambie de GGC (Gly) a GTC (Val), es la causa de la actividad transformante del oncogén *ras*H detectado en el ADN del carcinoma de vejiga.

Como ya se trató en el Capítulo 16, los genes *ras* codifican proteínas de unión a guanina que intervienen en la transducción de las señales mitogénicas a partir de diversos receptores de factores de crecimiento. La actividad de las proteínas Ras está controlada por la unión de GTP o GDP, de tal manera que alternan entre el estado activo (unidas a GTP) e inactivo (unidas a GDP) (véase Fig. 16.27). Las mutaciones características de los oncogenes *ras* tienen el efecto de mantener las proteínas Ras en la conformación activa unidas a GTP. En gran medida, esto se debe a que se anula la respuesta de las proteínas oncogénicas Ras a GAP (proteína activadora de la GTPasa), que activa la hidrólisis del GTP unido a Ras. Debido a que disminuye su actividad GTPasa intracelular, las proteínas oncogénicas Ras permanecen en su estado activo unidas a GTP y provocan la proliferación celular incontrolada.

Las mutaciones puntuales son solamente una de las maneras en las que los proto-oncogenes se convierten en oncogenes en los tumores humanos. Muchas células cancerosas muestran alteraciones en la estructura cromosómica, incluyendo translocaciones, duplicaciones y deleciones. Los reordenamientos génicos que resultan de la translocación cromosómica suelen tener como consecuencia la generación de oncogenes. En algunos casos, tras el análisis de estos reordenamientos se ha encontrado que en el desarrollo del tumor están implicados oncogenes ya conocidos. En otros casos, tras el análisis de las secuencias de ADN reordenadas y tras su clonaje molecular, se han encontrado oncogenes nuevos.

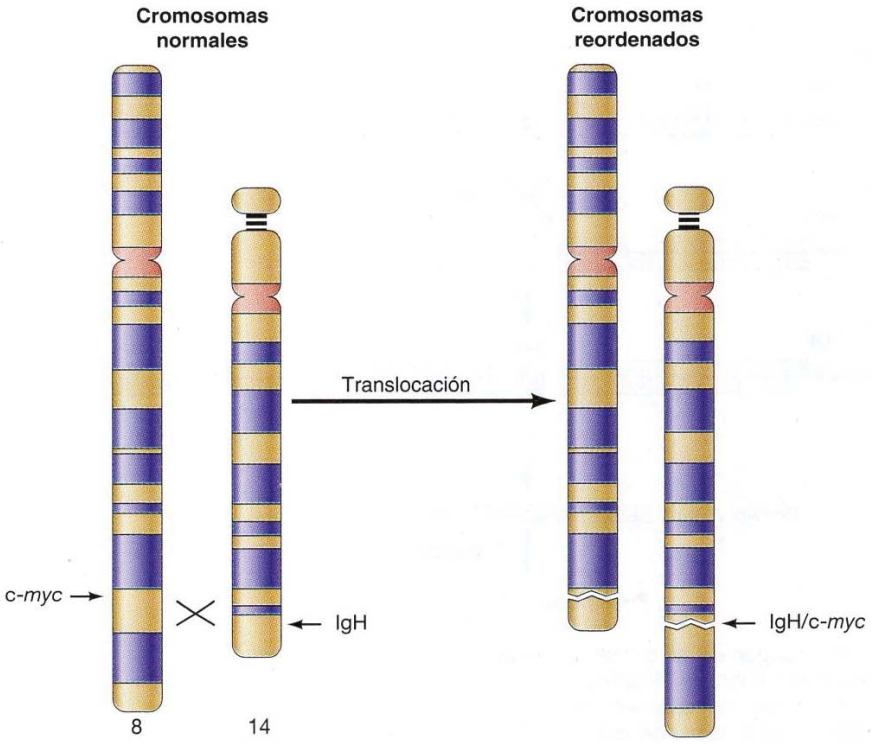


FIGURA 19.21 Translocación de c-*myc*. En el linfoma de Burkitt, el proto-oncogén c-*myc* se transloca desde el cromosoma 8 al *locus* de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) en el cromosoma 14; esto origina una expresión anormal de c-*myc*.

El primer caso caracterizado de la activación de un oncogén por translocación cromosómica fue el del oncogén **c-*myc*** en el linfoma de Burkitt humano y en plasmocitomas de ratón, que son cánceres de los linfocitos B productores de anticuerpos (**Fig. 19.21**). Ambos tumores se caracterizan por translocaciones cromosómicas en las que se ven im-

plicados genes que codifican inmunoglobulinas. Por ejemplo, en casi todos los linfomas de Burkitt se ha producido la translocación de un fragmento del cromosoma 8 a uno de los *loci* de las inmunoglobulinas, que se localizan en los cromosomas 2 (cadena ligera κ), 14 (cadena pesada) y 22 (cadena ligera λ). El hecho de que los genes de las inmunoglobulinas se expresen activamente en estos tumores sugiere que las translocaciones activan un proto-oncogén que se localizaba en el punto del cromosoma 8 mediante su inserción en los *loci* de las inmunoglobulinas. Esto se investigó mediante el análisis de los ADNs de tumores con sondas para oncogenes conocidos, y se descubrió que el proto-oncogén c-*myc* se localizaba en el punto de ruptura de la translocación del cromosoma 8 en el linfoma de Burkitt. Estas translocaciones insertaban a c-*myc* en un *locus* de la inmunoglobulina, donde se expresaba de una manera incontrolada. El gen c-*myc* codifica un factor de transcripción que se induce como respuesta a la estimulación por un factor de crecimiento, por lo que su expresión incontrolada basta para provocar la proliferación celular y contribuir al desarrollo del tumor.

Las translocaciones de otros proto-oncogenes dan como resultado reordenamientos de secuencias codificantes, lo que conduce a la formación de productos génicos alterados. El caso típico de esto es la translocación del proto-oncogén ***abl*** desde el cromosoma 9 al cromosoma 22, en la leucemia mielogénica crónica (**Fig. 19.22**). Esta translocación provoca la fusión de *abl* con su compañero de translocación, un gen denominado *bcr*, en el cromosoma 22. La consecuencia es que se produce una proteína de fusión Bcr-Abl en la que el extremo amino terminal normal de la proteína proto-oncogénica

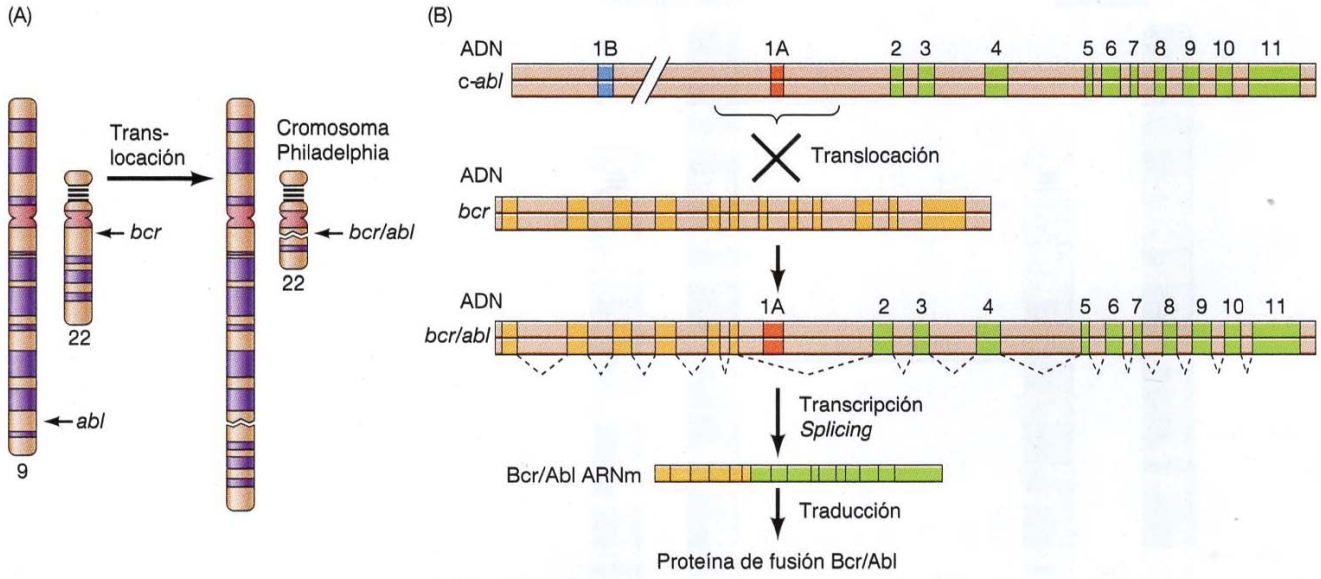


FIGURA 19.22 Translocación de *abl*. (A) El oncogén *abl* se transloca desde el cromosoma 9 al cromosoma 22 formando el cromosoma Philadelphia en las leucemias mielogénicas crónicas (CMLS). (B) El proto-oncogén *abl*, que tiene dos exones iniciales alternativos (1A y 1B), se integra en la mitad del gen *bcr* del cromosoma 22. El exón 1B se deleciona a consecuencia de la translocación. La transcripción del gen fusionado se inicia en el promotor de *bcr* y sigue a lo largo de *abl*. El *splicing* da lugar a un ARNm Bcr/Abl, en el que se ha delecionado el exón 1A de *abl* y las secuencias de *bcr* se han unido al exón 2 de *abl*. El ARNm Bcr/Abl se traduce para dar lugar a una proteína recombinante Bcr/Abl de fusión.

Abl se ha sustituido por unas secuencias de aminoácidos de Bcr. La fusión de las secuencias de Bcr da como resultado una actividad incontrolada de la proteína-tirosina quinasa Abl, lo que provoca la transformación celular.

Un mecanismo diferente mediante el que los oncogenes se activan en los tumores humanos es la amplificación génica, que da como resultado una expresión génica elevada. La amplificación de ADN (véase Fig. 7.40) es frecuente en las células tumorales, con una frecuencia mil veces mayor que en las células normales, y la amplificación de los oncogenes puede desempeñar un papel en la progresión de muchos tumores hacia un crecimiento más rápido y un mayor carácter maligno. Por ejemplo, c-*myc* y otros dos miembros de la familia *myc* (N-*myc* y L-*myc*) aparecen amplificados de manera frecuente en diversos tumores humanos, como los carcinomas de mama y pulmón. De igual modo, en los neuroblastomas se detectan copias de N-*myc*, cuya amplificación se vincula con tumores agresivos de desarrollo rápido. La amplificación de otro oncogén, *erb*B-2, que codifica un receptor tirosina quinasa presenta una relación similar con el crecimiento rápido de carcinomas de mama y ovario.

Funciones de los productos oncogénicos

Los oncogenes virales y los celulares definen un gran grupo de genes (alrededor de 150 en total) que contribuyen al comportamiento anormal de las células cancerosas. Como ya se ha dicho, muchas de las proteínas codificadas por los proto-oncogenes regulan la proliferación celular normal; en estos casos, la mayor expresión o la hiperactividad de la proteína oncogénica correspondiente produce la proliferación incontrolada de las células cancerosas. Otros productos oncogénicos contribuyen a otros aspectos del comportamiento de las células cancerosas, como la incapacidad de sufrir la muerte celular programada o la diferenciación defectuosa.

La función de las proteínas oncogénicas en la regulación de la proliferación celular está ilustrada por sus actividades en las vías de transducción de la señal estimuladas por factores de crecimiento, como la activación de la señalización de ERK corriente abajo de los receptores de proteínas-tirosina quinasas (**Fig. 19.23**). Las proteínas oncogénicas pertenecientes a esta vía incluyen factores de crecimiento polipeptídicos, receptores de factores de crecimiento, proteínas de señalización intracelular y factores de transcripción.

La acción de los factores de crecimiento como proteínas oncogénicas se debe a su expresión anormal, lo que conduce a una situación en la que la célula tumoral produce un factor de crecimiento al cual también responde. El resultado es una estimulación autocrina de la célula productora del factor de crecimiento (véase Fig. 19.9), lo que causa la proliferación anormal de la célula y contribuye al desarrollo de una gran variedad de tumores humanos.

Un gran grupo de oncogenes codifica receptores de factores de crecimiento, la mayoría de los cuales son proteína-tirosina quinasas. Estos receptores se suelen convertir en proteínas oncogénicas al sufrir alteraciones en sus dominios amino terminales, los cuales normalmente unirían factores de crecimiento extracelulares. Por ejemplo, el receptor para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) se convierte en un oncogén en algunas leucemias humanas debido a una translocación cromosómica en la que el extremo amino terminal normal del receptor de PDGF (PDGFR) se sustituye por una secuencia amino terminal de un factor de transcripción denominado Tel (**Fig. 19.24**). Las secuencias Tel de la proteína de fusión Tel/PDGFR resultante se dimerizan aunque no se le una el factor de crecimiento, lo que supone activar de manera constitutiva al dominio quinasa intracelular y la generación incontrolada de una señal proliferativa. Alternativamente, los genes que codifican receptores tirosina quinasas pueden ser activados mediante amplificación génica o mediante mutaciones pun-

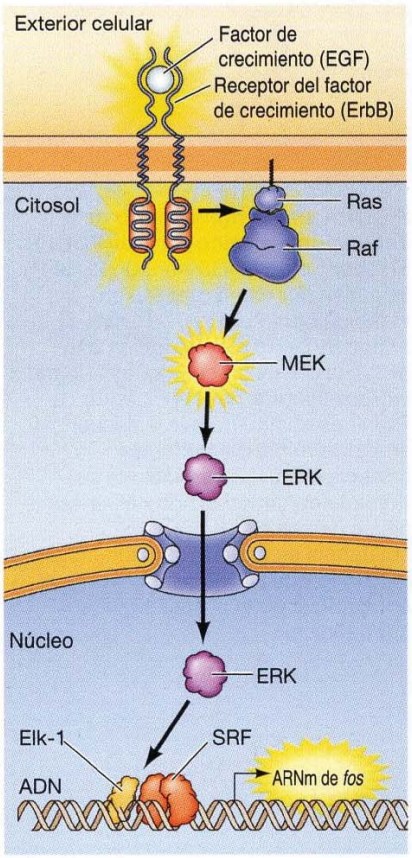


FIGURA 19.23 Oncogenes y transducción de señales. Las proteínas oncogénicas actúan como factores de crecimiento (p. ej., EGF), como receptores de los factores de crecimiento (p. ej., ErbB), y como moléculas señalizadoras intracelulares (Ras, Raf y MEK). Ras, Raf y MEK activan la vía de la quinasa MAP ERK (véanse Figs. 16.28 y 16.29), lo que supone la inducción de otros genes (p. ej., *fos*) que codifican proteínas reguladoras de la transcripción potencialmente oncogénicas. Las proteínas de las que se conoce su potencial oncogénico se resaltan en amarillo.

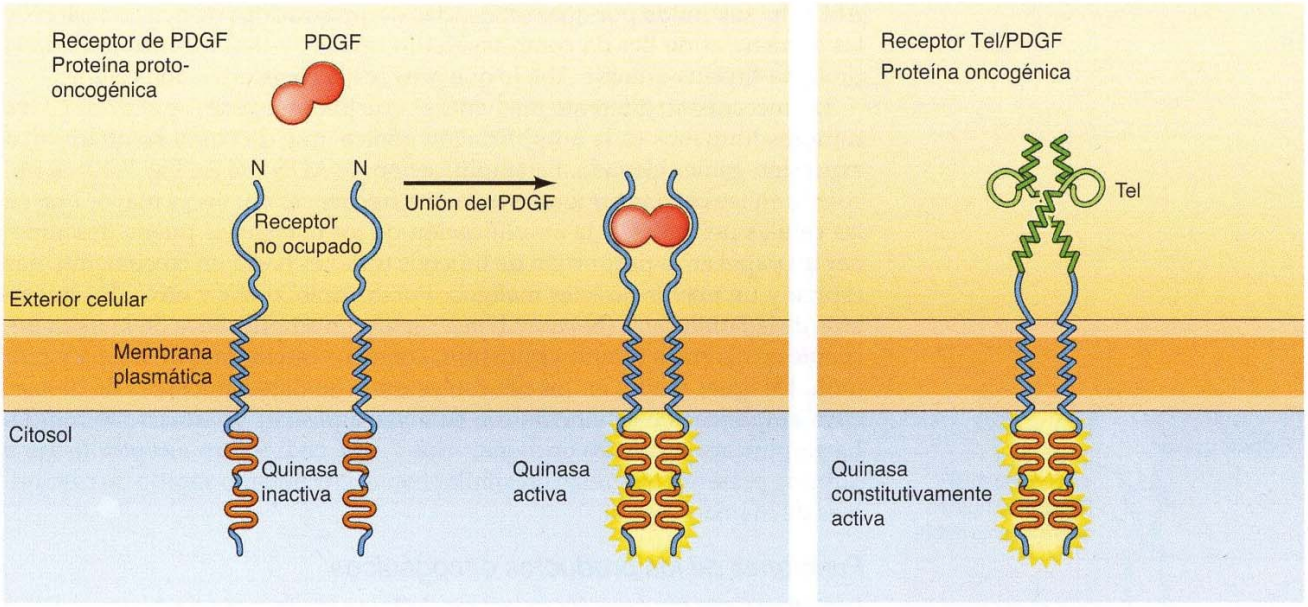


FIGURA 19.24 Mecanismo de la activación del oncogén Tel/PDGFR. El receptor de PDGF normal (PDGFR) se activa por una dimerización inducida por la unión del PDGF. El oncogén Tel/PDGFR codifica una proteína de fusión en la que el dominio extracelular normal del receptor de PDGF es sustituido por la secuencia amino terminal del factor de transcripción Tel, que incluye su dominio de dimerización hélice-bucle-hélice (véase Fig. 8.26D). Esta secuencia se dimeriza en ausencia de PDGF, lo que supone la activación constitutiva de la proteína quinasa oncogénica.

tuales que resultan en una actividad quinasa desregulada. Otros oncogenes (incluidos *src* y *abl*) codifican tirosina quinasas no receptoras que están continuamente activadas debido a deleciones o mutaciones de sus secuencias reguladoras.

Las proteínas Ras desempeñan un papel fundamental en la señalización de la mitosis, acoplando los receptores de los factores de crecimiento a la activación de la serina/treonina quinasa Raf, lo que inicia una cascada de proteína quinasa que conduce a la activación de la quinasa MAP ERK (véase Fig. 16.28). Como ya se trató anteriormente, las mutaciones que convierten a los proto-oncogenes *ras* en oncogenes provocan una activación continua de Ras, lo que lleva a la activación de la vía ERK. Los genes codificadores de Raf y MEK también pueden convertirse en oncogenes mediante mutaciones que resulten en una actividad proteína-cinasa no regulada, que del mismo modo conduce a la activación constitutiva de ERK.

La vía de las quinasas ERK lleva, en última instancia, a la fosforilación de factores de transcripción y a alteraciones en la expresión génica. Por tanto, como se podría suponer, muchos oncogenes codifican proteínas reguladoras de la transcripción que en condiciones normales se inducen en respuesta a la activación por factores de crecimiento. Por ejemplo, la transcripción del proto-oncogén *fos* se activa debido a la fosforilación de Elk-1 por la quinasa MAP ERK (véase Fig. 19.23). **Fos** y el producto de otro proto-oncogén, **Jun**, son componentes del factor de transcripción AP-1, que activa la transcripción de varios genes diana, incluyendo la ciclina D, en las células estimuladas por factores de crecimiento (**Fig. 19.25**). La actividad constitutiva de AP-1, debida a la expresión incontrolada de las proteínas oncogénicas Fos o Jun, es suficiente para producir la proliferación celular anormal que dará lugar a la transformación celular. De manera similar, las proteínas Myc funcionan como factores de transcripción regulados por estímulos mitogénicos, y la expresión anormal de los oncogenes *myc* contribuye al desarrollo de varios tumores humanos. En los linfomas y leucemias humanas, otros factores de transcripción se suelen activar a oncogenes debido a translocaciones cromosómicas.

Las vías de señalización intracelular que se activan mediante una estimulación por factores de crecimiento regulan, en última instancia, los compo-

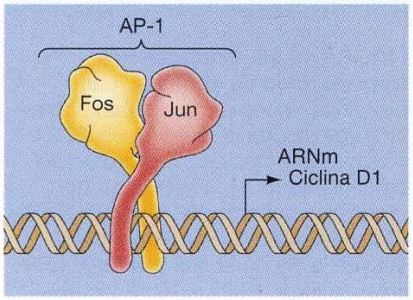


FIGURA 19.25 Factor de transcripción AP-1. Fos y Jun se dimerizan para constituir AP-1 que activa la transcripción de ciclina D1 y diversos genes inducibles por factores de crecimiento.

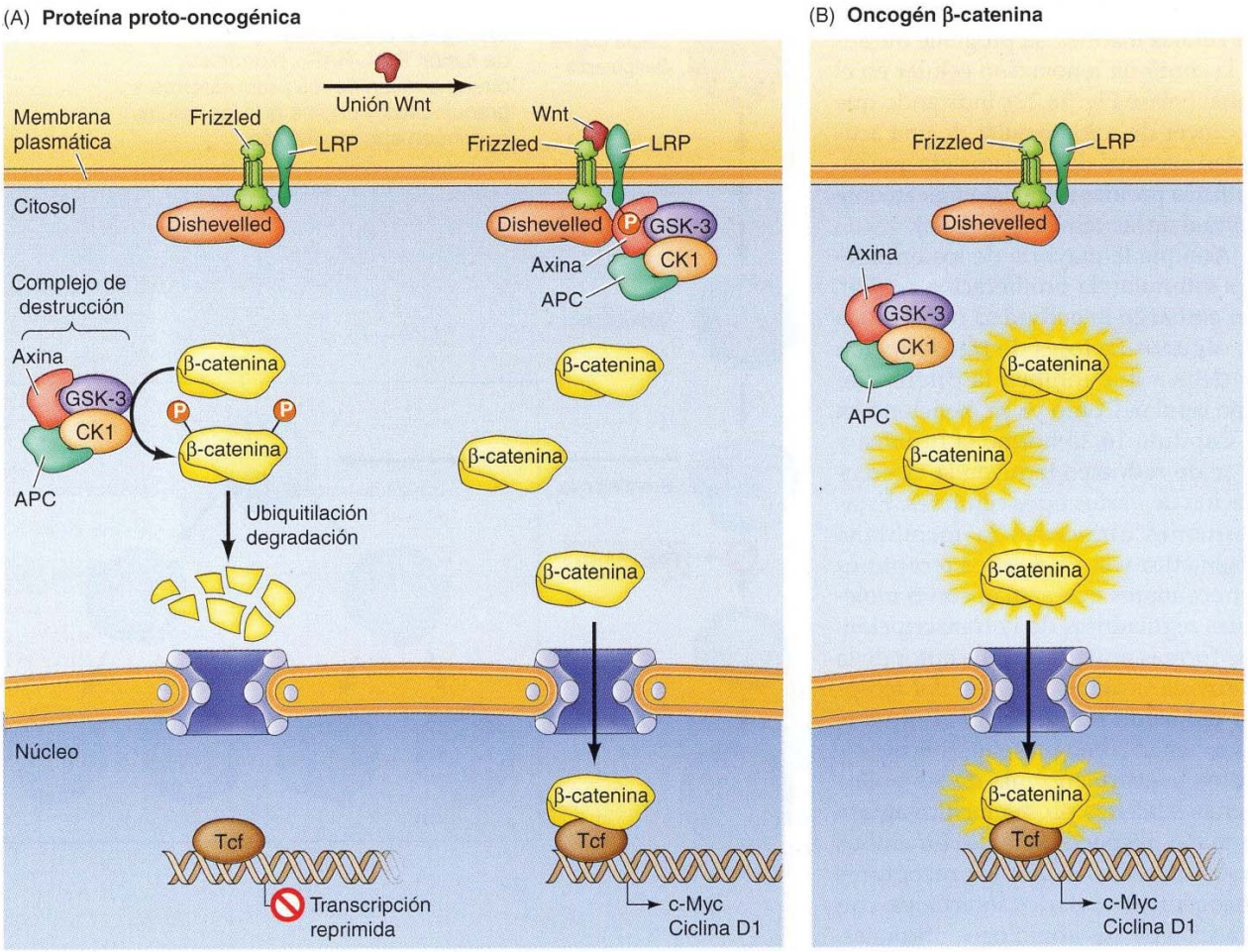


FIGURA 19.26 Actividad oncogénica de la β-catenina. (A) En una célula normal en ausencia de estimulación Wnt, la β-catenina es fosforilada por GSK-3 en un complejo con axina, APC y caseína quinasa-1 (el complejo de destrucción), lo que produce la ubiquitilación y degradación de la β-catenina. Los polipéptidos Wnt se unen a Frizzled y LRP e inducen el reclutamiento de Dishevelled, la inactivación del complejo de destrucción y la estabilización de β-catenina. A continuación, la β-catenina se transloca al núcleo y forma un complejo con factores de transcripción Tcf, a los que convierte de represores en activadores de sus genes diana, incluidos los genes que codifican c-Myc y ciclina D1. (B) Las mutaciones que evitan la degradación de β-catenina en ausencia de señalización Wnt la convierten en un oncogén.

nentes de la maquinaria del ciclo celular que inducen la progresión a través del punto de restricción en G_1. Las ciclinas de tipo D se activan en respuesta a la estimulación por los factores de crecimiento (al menos en parte a través de la activación del factor de transcripción AP-1) y desempeñan un papel fundamental como vínculos entre la señalización a través de dichos factores de crecimiento y la progresión del ciclo celular. No debe sorprender que el gen que codifica la ciclina D1 sea un proto-oncogén, que se puede activar para dar lugar a un oncogén (denominado ***CCND1***) mediante una translocación cromosómica o amplificación génica. Estas alteraciones conducen a la expresión constitutiva de la ciclina D1, lo que induce la proliferación celular en ausencia de la estimulación por los factores de crecimiento. El socio catalítico de la ciclina D1, Cdk4, también es activado como oncogén por mutaciones puntuales en los melanomas.

Los componentes de otras vías de señalización descritas en el Capítulo 16, incluyendo las vías de señalización acopladas a proteínas G, la vía NF-κB, y las vías Hedgehog, Wnt y Notch, también pueden actuar como oncogenes. Por ejemplo, las proteínas Wnt fueron identificadas como oncogenes en el cáncer de mama de ratón, y mutaciones activadoras frecuentemente convierten a la diana corriente abajo de Wnt, la β-catenina, en un oncogén (*CTNNB1*) en el cáncer de colon humano (**Fig. 19.26**). Estas mutaciones activadoras estabilizan a la β-catenina, que entonces forma un complejo con Tcf y estimula la transcripción de los genes diana. Las dianas de la β-catenina/Tcf incluyen los genes que codifican para c-Myc y la ciclina D1, dando lugar a la proliferación celular desregulada. Debe tenerse en cuenta que la señalización por Wnt nor-

malmente estimula la proliferación de las células madre y su progenie durante la continua renovación celular en el colon (véase Fig. 18.22), indicando que el cáncer de colon resulta de una actividad anormal de la misma vía que señaliza la proliferación fisiológicamente normal de las células epiteliales.

Aunque la mayoría de los oncogenes estimulan la proliferación celular, sin embargo la actividad oncogénica de algunos factores de transcripción se debe a que inhiben la diferenciación celular. Como ya se mencionó en el Capítulo 16, la hormona tiroidea y el ácido retinoico inducen la diferenciación de varios tipos celulares. Estas hormonas atraviesan la membrana plasmática y se unen a los receptores intracelulares que actúan como moléculas reguladoras de la transcripción. Las formas mutadas del receptor de la hormona tiroidea (**ErbA**) y del receptor del ácido retinoico (**PML/RARα**) intervienen como proteínas oncogénicas en la eritroleucemia de los pollos y en la leucemia promielocítica aguda humana, respectivamente. En ambos casos, parece ser que los receptores oncogénicos mutados interfieren con la acción de sus homólogos normales, bloqueando la diferenciación celular y manteniendo las células leucémicas proliferando de manera activa (**Fig. 19.27**). En el caso de la leucemia promielocítica aguda, unas altas dosis de ácido retinoico pueden vencer el efecto de la proteína oncogénica PML/RARα e inducir la diferenciación de las células leucémicas. Esta observación biológica tiene una implicación clínica: se puede tratar de manera efectiva a los pacientes con leucemia promielocítica aguda administrándoles ácido retinoico, que induce la diferenciación y bloquea la proliferación celular.

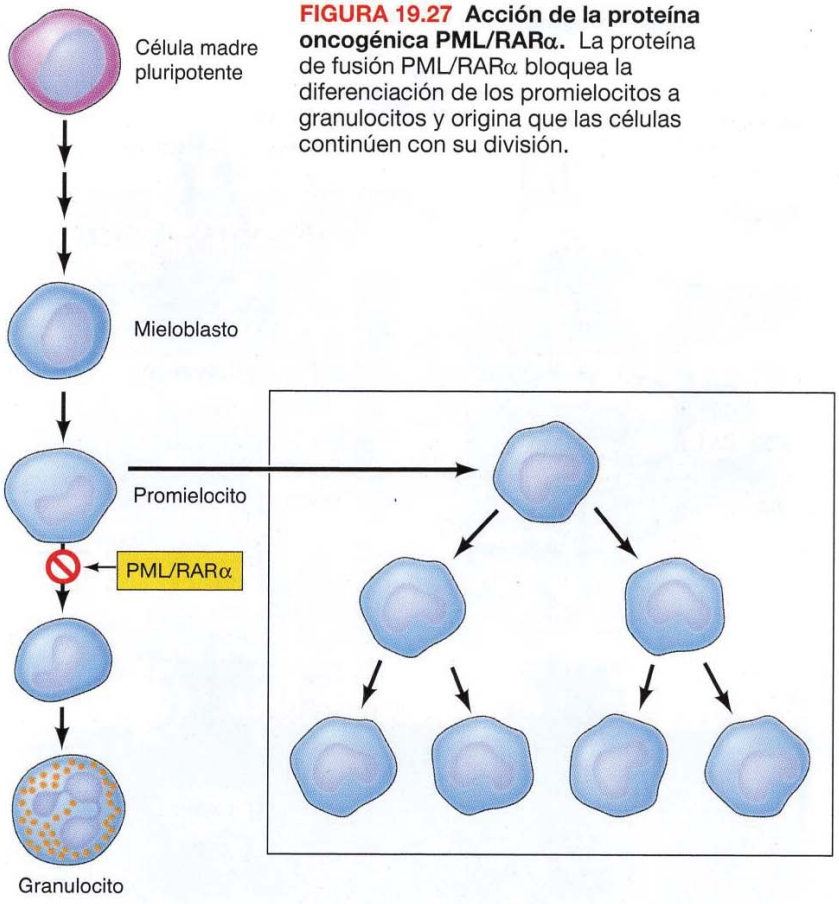


FIGURA 19.27 Acción de la proteína oncogénica PML/RARα. La proteína de fusión PML/RARα bloquea la diferenciación de los promielocitos a granulocitos y origina que las células continúen con su división.

Como ya se trató anteriormente en este capítulo, la incapacidad de las células cancerosas de sufrir la muerte celular programada, o apoptosis, es un factor crítico en el desarrollo de tumores, y varios oncogenes codifican proteínas que intervienen promoviendo la supervivencia celular (**Fig. 19.28**). La supervivencia de la mayoría de las células animales depende de su estimulación por los factores de crecimiento, por lo que aquellos oncogenes que codifican factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y proteínas señalizadoras como Ras, intervienen no sólo estimulando la proliferación celular sino también evitando la muerte celular. Como ya se trató en el Capítulo 18, la vía de señalización de la PI 3-quinasa/Akt desempeña un papel fundamental en la prevención de la apoptosis de muchas células dependientes de los factores de crecimiento, y los genes que codifican la **PI 3-quinasa** y **Akt** actúan como oncogenes en los retrovirus y en algunos tumores humanos. Entre las dianas de la PI 3-quinasa/Akt se incluye un miembro de la familia Bcl-2, Bad, que es inactivado como resultado de la fosforilación por Akt, además del factor de transcripción FOXO, que regula la expresión del miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, Bim. Adicional-

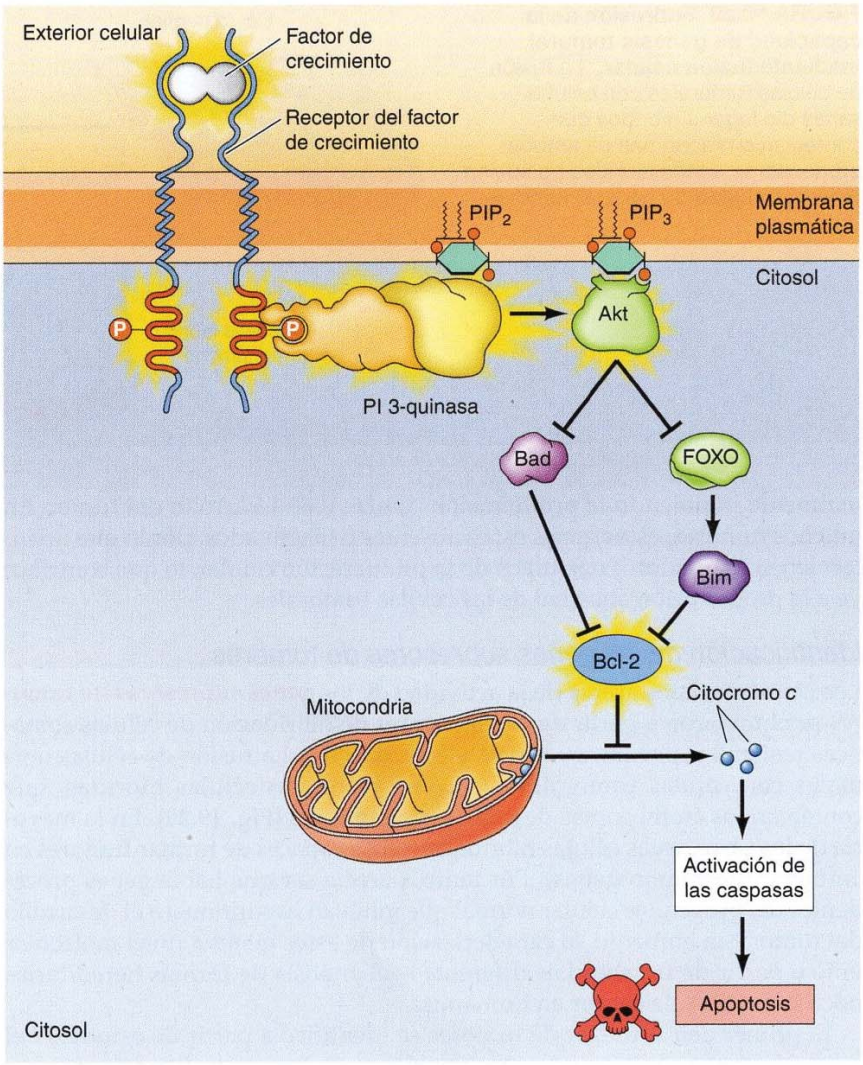


FIGURA 19.28 Oncogenes y supervivencia celular. Entre las proteínas oncogénicas que actúan como señales de supervivencia celular se incluyen factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, la PI 3 quinasa, Akt y Bcl-2. Las dianas de Akt incluyen al miembro Bad de la familia proapoptótica Bcl-2 y al factor de transcripción FOXO, que estimula la transcripción de otro miembro de la familia proapoptótica Bcl-2, Bim. La fosforilación por Akt inhibe tanto a Bad como a FOXO, estimulando la supervivencia celular. La proteína Bcl-2 también funciona como un oncogén estimulando la supervivencia celular e inhibiendo la liberación de citocromo *c* desde las mitocondrias. Las proteínas con potencial oncogénico están marcadas con un brillo amarillo.

mente, resulta notable que el propio **Bcl-2** fue descubierto en primer lugar como el producto de un oncogén en linfomas humanos. El oncogén *bcl*-2 se genera mediante una translocación cromosómica cuya consecuencia es una expresión elevada de Bcl-2, lo que bloquea la apoptosis y mantiene la supervivencia celular bajo condiciones que normalmente inducirían la muerte de la célula. La identificación de *bcl*-2 como un oncogén no sólo proporcionó la primera demostración acerca de la importancia de la muerte celular programada en el desarrollo del cáncer, sino que llevó al descubrimiento del papel que tienen Bcl-2 y otros genes relacionados como reguladores principales de la apoptosis en organismos que van desde *C. elegans* hasta el ser humano.

Genes supresores de tumores

La activación de los oncogenes celulares sólo representa uno de los dos tipos de alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo del tumor; la otra es la inactivación de los genes supresores de tumores. Los oncogenes causan la proliferación anormal de las células debido a alteraciones genéticas que incrementan la expresión génica o producen la hiperactividad de las proteínas codificadas por los oncogenes. Los genes supresores de tumores representan un mecanismo opuesto de control del crecimiento celular, nor-

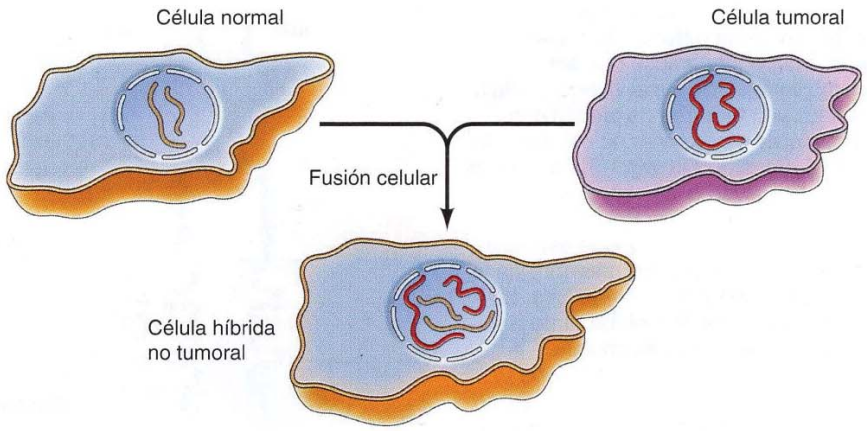


FIGURA 19.29 Supresión de la capacidad de génesis tumoral mediante fusión celular. La fusión de células tumorales con células sanas dio lugar a híbridos que contenían cromosomas de ambos progenitores. Estos híbridos no suelen tener capacidad de generar tumores.

malmente inhibiendo la proliferación celular y el desarrollo del tumor. En muchos tumores, estos genes están ausentes o inactivados, por lo que no intervienen reguladores negativos de la proliferación celular, lo que contribuye a la proliferación anormal de las células tumorales.

Identificación de los genes supresores de tumores

Los primeros datos acerca de la actividad de los **genes supresores de tumores** se obtuvieron a partir de experimentos de hibridación de células somáticas realizados por Henry Harris y cols. en 1969. La fusión de células normales con células tumorales dio como resultado células híbridas, que contenían los cromosomas de ambos progenitores (**Fig. 19.29**). En la mayoría de los casos, estas células híbridas no eran capaces de formar tumores en animales (no tumorógenas). Por tanto, parecía ser que había genes procedentes del progenitor celular normal que inhibían (o suprimían) el desarrollo del tumor. Sin embargo, la caracterización de estos genes a nivel molecular vino a partir de un abordaje diferente —el análisis de formas hereditarias poco frecuentes de cáncer en humanos.

VÍDEO 19.3

sites.sinauer.com/cooper7e/v19.3

Regulación de genes supresores de tumores. La disrupción de la expresión de genes supresores de tumores lleva a que la célula cancerosa se divida cuando no debe.

El primer gen supresor de tumores se identificó a partir de estudios del retinoblastoma, un tumor de ojos en niños poco frecuente. Siempre y cuando la enfermedad se detecte tempranamente, el retinoblastoma puede ser tratado con éxito, y muchos pacientes sobreviven teniendo descendencia. Así se llegó a la conclusión de que muchos casos de retinoblastoma son hereditarios. En estos casos, aproximadamente el 50% de los hijos de un progenitor afectado desarrollarán el retinoblastoma, lo que concuerda con la transmisión Mendeliana de un único gen dominante que confiere susceptibilidad al desarrollo del tumor (**Fig. 19.30**).

Aunque la susceptibilidad de sufrir retinoblastoma se transmite como un carácter dominante, la herencia de este gen no es suficiente para transformar una célula normal de la retina en una célula tumoral. Todas las células de la retina del paciente heredarán el gen, pero sólo una pequeña parte de estas células darán lugar al tumor. Así, el desarrollo del tumor requiere otros procesos además de la herencia de la susceptibilidad al tumor. En 1971, Alfred Knudson propuso que para que se desarrolle el retinoblastoma se requieren dos mutaciones; ahora se sabe que éstas corresponden a la pérdida de las dos copias funcionales del gen (el gen supresor de tumores *Rb*) presente en los cromosomas homólogos de una célula diploide normal (**Fig. 19.31**). En

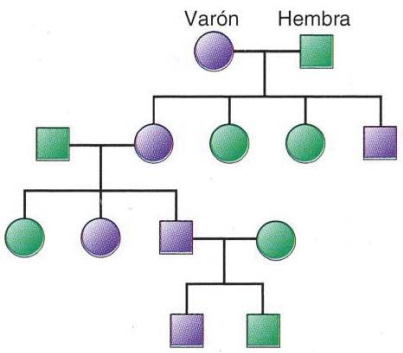


FIGURA 19.30 Herencia del retinoblastoma. La susceptibilidad de sufrir retinoblastoma se transmite a cerca del 50% de la descendencia. Los símbolos morados y verdes indican los individuos afectados y sanos, respectivamente.

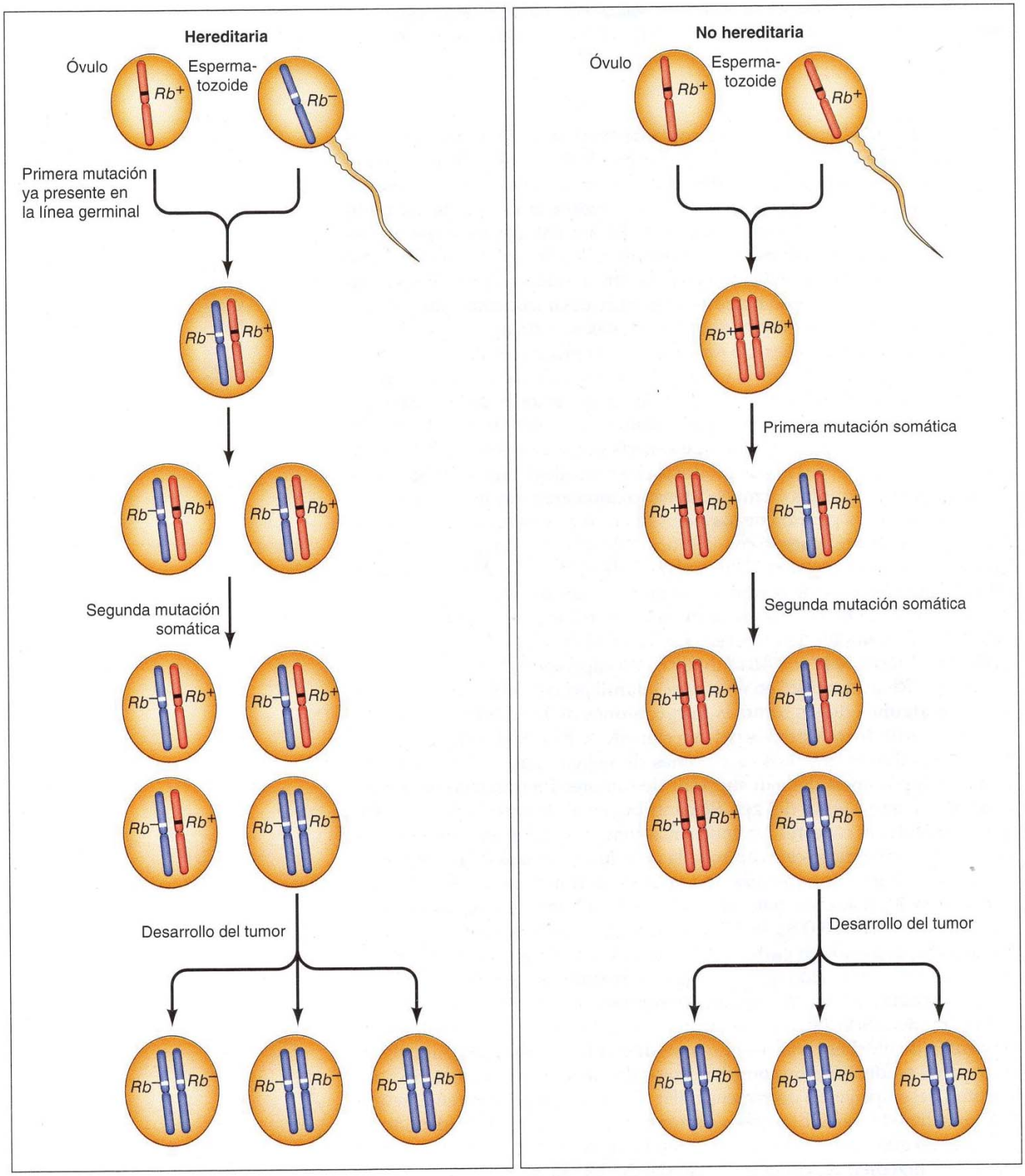
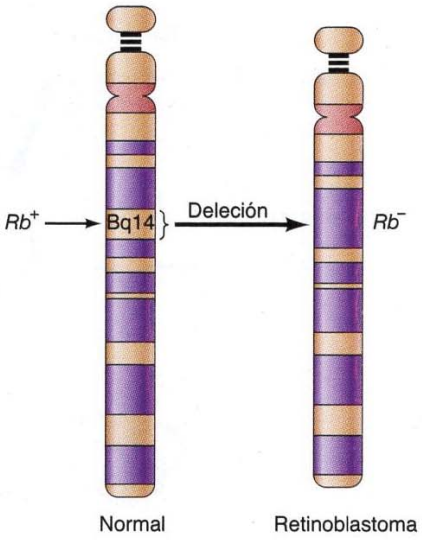


FIGURA 19.31 Mutaciones de *Rb* durante el desarrollo del retinoblastoma. En el retinoblastoma hereditario se hereda del progenitor afectado una copia defectuosa del gen *Rb* (Rb^-). Una segunda mutación somática, que inactiva la única copia sana Rb^+ de la célula de la retina, provoca el desarrollo del retinoblastoma. En los casos no hereditarios, se heredan dos genes Rb^+ normales, y sólo se desarrolla el retinoblastoma si dos mutaciones somáticas inactivan ambas copias de *Rb* en la misma célula.

FIGURA 19.32 Deleciones de *Rb* en el retinoblastoma. Muchos retinoblastomas tienen deleciones en el *locus* cromosómico (13q14) donde se localiza el gen *Rb*.



el retinoblastoma hereditario, una copia defectuosa de *Rb* se transmite genéticamente. La pérdida de esta única copia de *Rb* no es suficiente por sí misma para que se produzca el desarrollo del tumor, pero en estos individuos se suele desarrollar el retinoblastoma debido a una segunda mutación somática que produce la pérdida del alelo *Rb* normal. Las personas afectadas desarrollan a menudo múltiples tumores en los dos ojos, donde cada tumor procede de una segunda mutación somática independiente. Por el contrario, el retinoblastoma no hereditario es muy poco frecuente, ya que para que se desarrolle se requieren dos mutaciones somáticas independientes para inactivar ambas copias del *Rb* normal de la misma célula.

La función del gen *Rb* como un regulador negativo del desarrollo de tumores se dedujo inicialmente a partir de las observaciones de la morfología de los cromosomas. En algunos retinoblastomas se encontraron deleciones visibles del cromosoma 13q14, lo que sugería que era la pérdida del gen *Rb* (en vez de su activación) lo que producía el desarrollo del tumor (**Fig. 19.32**). Posteriormente, estudios de mapeo genético indicaron que el desarrollo del tumor se debía a la pérdida de los alelos *Rb* normales en las células tumorales, lo que estaba de acuerdo con la función de *Rb* como un gen supresor de tumores. El clonaje de *Rb* en 1986 estableció de manera definitiva que en los retinoblastomas *Rb* se ha perdido o ha mutado. Los experimentos de transferencia génica también demostraron que si se introducía un gen *Rb* normal en células de retinoblastoma revertía su capacidad tumoral, lo que era una evidencia directa de la actividad de *Rb* como supresor de tumores.

Aunque *Rb* se identificó en un cáncer infantil poco común, también interviene en algunos de los tumores más comunes de los adultos. Concretamente, a partir de los estudios del gen clonado se ha establecido que *Rb* falta o es inactivo en muchos carcinomas de vejiga, mama y pulmón. Por tanto, la importancia del gen supresor de tumores *Rb* trasciende al retinoblastoma, y mutaciones del gen *Rb* contribuyen al desarrollo de una parte importante de los cánceres humanos más comunes. Además, como se mencionó anteriormente en este capítulo, la proteína Rb es una diana importante de las proteínas oncogénicas de varios virus tumorales de ADN, incluyendo al SV40, al adenovirus y al papilomavirus humano, que se unen a Rb e inhiben su actividad (**Fig. 19.33**). Por tanto, la transformación por estos virus se debe, al menos en parte, a la inactivación de Rb a nivel de proteínas, en vez de a una mutación que cause la inactivación del gen *Rb*.

La caracterización de *Rb* como un gen supresor de tumores sirvió como modelo para identificar otros genes supresores de tumores que contribuyen al desarrollo de muchos cánceres humanos diferentes (**Tabla 19.5**). Algunos de estos genes se identificaron como las causas de cánceres hereditarios poco frecuentes, desempeñando un papel similar al que desempeña *Rb* en el retinoblastoma hereditario. Otros genes supresores de tumores se han identificado como genes que con frecuencia faltan o están mutados en cánceres adultos comunes no hereditarios, como es el caso del carcinoma de colon. En cualquier caso, parece ser que la mayoría de los genes supresores de tumores intervienen en el desarrollo de tipos de cáncer hereditarios y no hereditarios. Así, la mutación de algunos genes supresores de tumores parece ser la alteración molecular más común responsable del desarrollo de un tumor humano.

El siguiente gen supresor de tumores identificado fue *p53*, que suele encontrarse inactivado en una gran variedad de cánceres humanos, incluyendo leucemias, linfomas, sarcomas, tumores cerebrales y carcinomas de di-

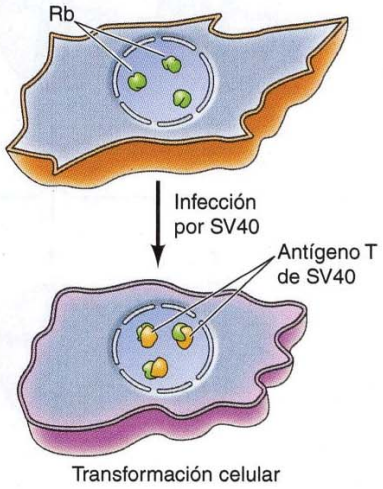


FIGURA 19.33 Interacción de Rb con proteínas oncogénicas de virus tumorales de ADN. Las proteínas oncogénicas de varios virus tumorales de ADN (p. ej., el antígeno T de SV40) inducen la transformación mediante la unión y la inactivación de la proteína Rb.

◆ Inicialmente se creía que p53 era un oncogén porque los genes mutados de p53 encontrados en muchas células cancerosas inducía la transformación en ensayos de transferencia génica. Estudios posteriores demostraron que p53 era en realidad un supresor de tumores y que los genes de p53 mutantes encontrados en muchos tumores, actuaban como dominantes negativos que inducían la transformación interfiriendo con la función normal de p53.

TABLA 19.5 Genes supresores de tumores

Gen	Tipo de cáncer
APC	Carcinoma de colon/recto
BRCA1	Carcinomas de mama y ovario
BRCA2	Carcinoma de mama
INK4	Melanoma, carcinoma de pulmón, tumores cerebrales, leucemias, linfomas
p53	Tumores cerebrales; carcinomas de mama, de colon/recto, de esófago, hepático y de pulmón; sarcomas; leucemias y linfomas
PTCH	Carcinoma de las células basales
PTEN	Tumores cerebrales; melanoma; carcinomas de próstata, endometrio, riñón y pulmón
Rb	Retinoblastoma; sarcomas; carcinomas de vejiga, mama y pulmón
Smad2	Carcinoma de colon/recto
Smad4	Carcinoma de colon/recto, carcinoma pancreático
Tβ RII	Carcinoma de colon/recto, carcinoma gástrico

versos tejidos, como los de mama, colon y pulmón. En total las mutaciones de *p53* intervienen en el 50% de los cánceres, lo que hace de él la diana susceptible de alteraciones genéticas más frecuente en los cánceres humanos. También hay que destacar que las mutaciones hereditarias de *p53* son las responsables de la transmisión genética de un síndrome canceroso hereditario poco frecuente, en el que los individuos afectados desarrollan cualquier tipo de cáncer. Además, la proteína p53 (al igual que Rb) es una diana para las proteínas oncogénicas del SV40, adenovirus y papilomavirus humano.

Al igual que *p53*, los genes supresores de tumores *INK4 y PTEN* se encuentran frecuentemente mutados en cánceres comunes, incluyendo el cáncer de pulmón, de próstata y el melanoma. Otros genes supresores de tumores que intervienen en las vías de Wnt (APC) y TGF-β (*Smad2* y *Smad4*) a menudo se encuentran inactivados en los cánceres de colon. Además de estar implicados en casos no hereditarios de cáncer común en adultos, las mutaciones hereditarias del gen *APC* son responsables de una forma infrecuente hereditaria de cáncer de colon, denominada poliposis adenomatosa familiar. Los individuos que padecen esta condición desarrollan cientos de adenomas benignos en el colon (pólipos), algunos de los cuales inevitablemente progresan hacia la malignidad. Las mutaciones heredadas de otros dos genes supresores de tumores, *BRCA1* y *BRCA2*, son responsables de los casos hereditarios de cáncer de mama, que constituyen el 5% del total de la incidencia del cáncer de mama. Las mutaciones en otros genes supresores de tumores son las responsables de otros síndromes de cáncer hereditario infrecuentes y más de 50 genes supresores de tumores se han visto implicados en el desarrollo de tipos frecuentes de cáncer humano.

Funciones de los productos de los genes supresores de tumores

A diferencia de las proteínas oncogénicas y proto-oncogénicas, las proteínas codificadas por la mayoría de los genes supresores de tumores inhiben la proliferación o la supervivencia de la célula. Por tanto, la inactivación de los genes supresores de tumores conduce al desarrollo del tumor eliminando proteínas de regulación negativa. En varios casos las proteínas supresoras de tumores inhiben las mismas vías reguladoras que se activan por los productos de los oncogenes.

Un ejemplo interesante del antagonismo entre los productos oncogénicos y los productos de los genes supresores de tumores es la proteína codificada

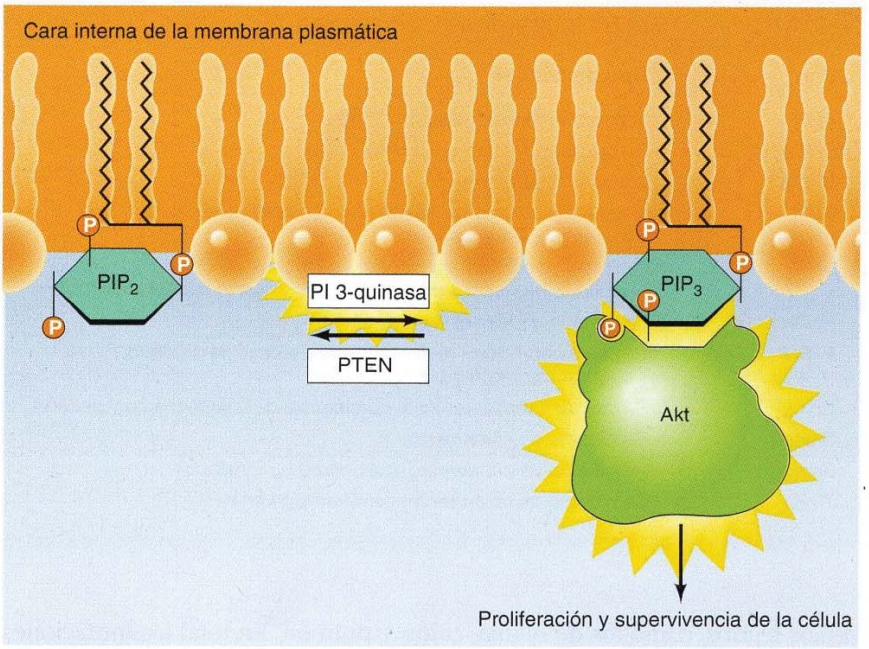


FIGURA 19.34 Supresión de la supervivencia celular por PTEN. La proteína supresora de tumores PTEN es una fosfatasa lipídica que desfosforila PIP_3 en la posición 3 del inositol, dando lugar a PIP_2. Así, PTEN contrarresta la actividad de los oncogenes PI 3-quinasa y Akt que promueven la supervivencia celular.

por el gen supresor de tumores *PTEN* (**Fig. 19.34**). La proteína PTEN es una fosfatasa lipídica que desfosforila la posición 3 de los fosfatidilinosítidos, como el fosfatidilinositol 3, 4, 5-bifosfato (PIP_3). Mediante la desfosforilación de PIP_3, PTEN ejerce el efecto contrario al de la PI3-quinasa y Akt, que actúan como oncogenes al promover la supervivencia celular, además de estimular la proliferación celular. Por el contrario, la inactivación o pérdida de la proteína supresora de tumores PTEN puede contribuir al desarrollo del tumor debido a que en tal caso aumentarán los niveles de PIP_3, se activará Akt, y se inhibirá la muerte celular programada.

Las proteínas codificadas por los oncogenes y por los genes supresores de tumores también intervienen en la vía de señalización de Hedgehog (véase Fig. 16.41). *Patched* (que codifica el receptor de Hedgehog) es un gen supresor de tumores de los carcinomas de células basales, mientras que el gen que codifica Smoothened (inhibido por Patched) actúa como un oncogén. Por otra parte, los factores de transcripción Gli, que resultan inactivados por Smoothened, se identificaron inicialmente como proteínas codificadas por un oncogen (*gli*) que se amplificaba en los glioblastomas (tumores cerebrales malignos).

Varios genes supresores de tumores codifican proteínas reguladoras de la transcripción. Un ejemplo serían los genes supresores de tumores *Smad2* y *Smad4*, que codifican factores de transcripción activados por señales de la vía de TGF-β e inducen la inhibición de la proliferación celular (véase Fig. 16.39). Entre los genes diana inducidos por la proteínas Smad figuran los inhibidores de Cdk, p15, p21, p27 y p57 (véase Tabla 17.1), los cuales estimulan la detención de la proliferación celular en la fase G_1 del ciclo celular. Otro gen supresor de tumores (*TβRII*) codifica el receptor de TGF-β, lo que respalda la implicación de la vía de TGF-β en la inhibición de la proliferación celular.

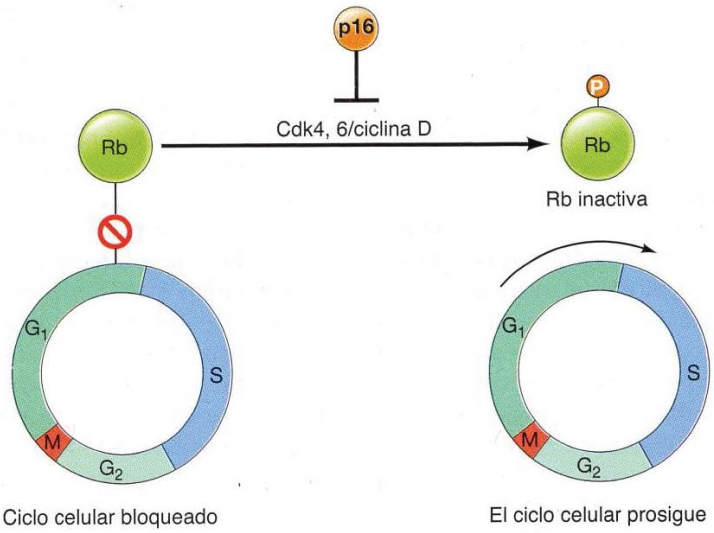


FIGURA 19.35 Inhibición de la progresión del ciclo celular por Rb y p16. Rb inhibe la progresión a través del punto de restricción en G_1. Los complejos Cdk4, 6/ciclina D promueven el paso a través del punto de restricción mediante la fosforilación e inactivación de Rb. La actividad de Cdk4, 6/ciclina D es inhibida por p16. Rb y p16 son supresores de tumores, mientras que la ciclina Cdk4 y son oncogenes.

Los productos de los genes supresores de tumores *Rb* e *INK4* regulan la progresión del ciclo celular en el mismo lugar en el que lo hace la ciclina Cdk4 y D1, siendo ambos capaces de actuar como oncogenes (**Fig. 19.35**). Rb inhibe el paso a través del punto de restricción en G_1 reprimiendo la transcripción de determinados genes relacionados con la progresión del ciclo celular y la síntesis del ADN (véase Fig. 17.16). En las células normales el paso a través de este punto de restricción se regula por los complejos Cdk4, 6/ciclina D, que fosforilan e inactivan a Rb. Por tanto, la inactivación de *Rb* en los tumores debido a su mutación supone la pérdida de un regulador negativo de la progresión del ciclo celular. El gen supresor de tumores *INK4*, que codifica al inhibidor p16 de Cdk, también regula el paso a través del punto de restricción. Como ya se trató en el Capítulo 17, p16 inhibe la actividad de Cdk4, 6/ciclina D (véase Tabla 17.1). Por tanto, la inactivación de *INK4* tiene como consecuencia el aumento de la actividad de los complejos Cdk4, 6/ciclina D, lo que da lugar a una fosforilación incontrolada de Rb.

El producto del gen *p53* regula tanto la progresión del ciclo celular y la apoptosis. El ADN dañado desencadena la rápida inducción de p53, que activa la transcripción de los genes proapoptóticos e inhibidores del ciclo celular (**Fig. 19.36**). p53 bloquea la progresión del ciclo celular como respuesta una lesión en el ADN mediante la inducción del inhibidor Cdk p21 (véase Fig. 17.20). La proteína p21 bloquea la progresión del ciclo celular en G1 al inhibir los complejos Cdk2/ciclina E, y la interrupción resultante del ciclo celular resultante da tiempo supuestamente a la reparación del daño en el ADN antes de que se replique. La pérdida de p53 impide la detención del ciclo celular inducida por la lesión, lo cual conduce a un incremento de las frecuencias de mutación y a una inestabilidad general del genoma de la célula. Como se ha indicado anteriormente, la inestabilidad genética es una propiedad común de las células cancerosas, que contribuye a alteraciones adicionales en los oncogenes y los genes de supresión tumoral durante la progresión del tumor.

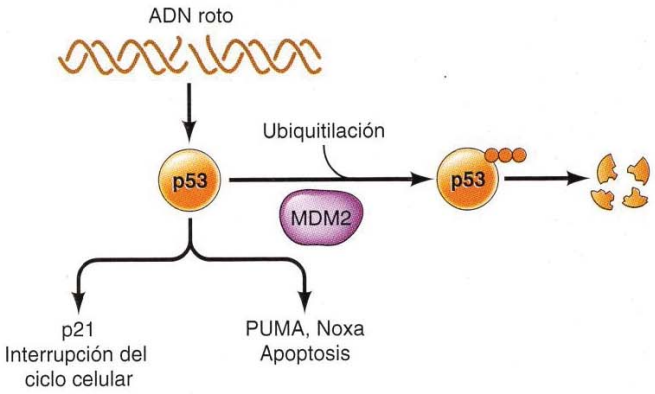


FIGURA 19.36 Acción de p53. La p53 salvaje (*wild-type*) se requiere para que el ciclo celular se detenga y p53 es necesario para la interrupción del ciclo celular y la apoptosis inducida por daños en el ADN. La detención del ciclo celular está mediada por la inducción del inhibidor de Cdk p21 y la apoptosis por la inducción de los miembros de la familia proapoptótica Bcl-2 PUMA y Noxa. La proteína oncogénica MDM2 es una ubiquitina ligasa que se dirige a p53 para su degradación.

Pueden producirse daños más extensos en el ADN en un nivel superior de inducción de p53, para dar lugar a apoptosis. La inducción de la apoptosis por p53 está mediada en parte por la activación de la transcripción de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (PUMA y Noxa) que inducen la muerte celular programada. El ADN lesionado sin reparar normalmente induce apoptosis en las células de mamífero, una respuesta que presumiblemente es ventajosa para el organismo porque elimina las células que portan mutaciones potencialmente deletéreas (p. ej., las células podrían desarrollarse para dar células cancerosas). Las células que carecen de p53 no sufren apoptosis en respuesta a agentes que dañan al ADN, incluyendo la radiación y muchos de los principios activos empleados en la quimioterapia contra el cáncer. Este fallo a sufrir apoptosis en respuesta al ADN dañado contribuye a la resistencia de muchos tumores a la quimioterapia. Adicionalmente, la pérdida de p53 parece interferir con la apoptosis inducida por otros estímulos, como la privación de factores de crecimiento y la privación de oxígeno. Estos efectos de p53 sobre la supervivencia celular se cree que son responsables de la elevada frecuencia de mutaciones de *p53* en los cánceres humanos. Consistente con un papel central para *p53* como un supresor tumoral, la ubiquitina ligasa que se dirige a *p53* para degradación es codificada por un oncogén (denominado *MDM2*) cuya sobreexpresión favorece la proliferación y la supervivencia de la célula al reducir los niveles de p53 (véase Fig. 19.36).

Igualmente, los productos de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que están implicados en algunas formas de cáncer hereditario de mama y de ovario, parecen participar en el control de los puntos de chequeo de la progresión del ciclo celular y la reparación de las roturas de doble hebra en el ADN. Por tanto, *BRCA1* y *BRCA2* funcionan como **genes de estabilidad**, que actúan para mantener la integridad del genoma. Las mutaciones en genes de este tipo dan lugar al desarrollo de cáncer no como resultado de efectos directos sobre la proliferación o supervivencia celular sino porque su inactivación da lugar a una elevada frecuencia de mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores. Otros genes de estabilidad cuya pérdida contribuye al desarrollo del cáncer en el hombre incluyen al gen *ATM*, que actúa en el punto de control de lesiones en el ADN (véase Fig. 17.19), los genes de reparación del apareamiento incorrecto que son defectuosos en algunos cánceres colorrectales hereditarios (véase Cap. 7, Medicina Molecular), y los genes de reparación por escisión nucleotídica que están mutados en el xeroderma pigmentoso (véase Fig. 7.23).

Como se ha comentado en capítulos anteriores, actualmente se considera que los microARN (ARNmi) son unos reguladores destacados de la expresión génica en las células eucarióticas. En las células animales, los ARNmi intervienen después de la transcripción a nivel del ARNm para inhibir la traducción y/o inducir la degradación de moléculas de ARNm (véase Fig. 9.20). Se cree que los ARNmi participan en la regulación de aproximadamente la mitad de todos los genes que codifican proteínas, por lo que es muy posible que estén implicados en el desarrollo tumoral. La expresión de ARNmi en muchos tumores presenta ciertas alteraciones características en comparación con las células normales, lo que concuerda con esta noción. Por lo general, la expresión de los ARNmi es significativamente más baja en las células tumorales, lo que indica que muchas de estas moléculas podrían actuar como supresores de tumores. Los resultados de algunos trabajos recientes han respaldado esta hipótesis, ya que la interferencia con la síntesis de ARNmi incrementa la tasa de transformación celular y desarrollo tumoral. Un ejemplo de estos ARNmi supresores de tumores es *let-7*, dirigido a oncogenes tales como *c-myc* y *ras*K (**Fig. 19.37**). p53 induce otra molécula de ARNmi que actúa como supresor tumoral (*miR-34*) y actúa a nivel de moléculas de ARNm que codifican varias proteínas que estimulan la progresión

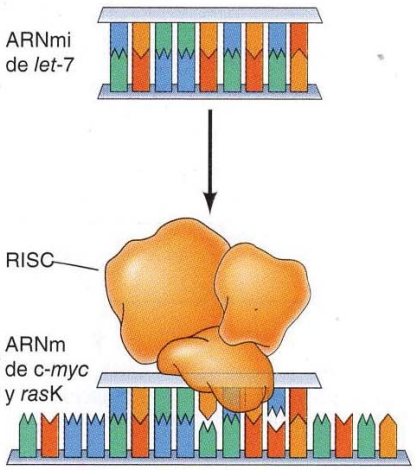


FIGURA 19.37 Acción supresora tumoral del ARNmi de *let-7*. El ARNmi de *let-7* actúa sobre ARNm que codifican las proteínas oncogénicas c-Myc y RasK.

del ciclo celular (p. ej., Cdk4, Cdk6 y ciclina E) y favorecen la supervivencia celular (como Bcl-2). No obstante, no todos los ARNmi poseen actividad supresora de tumores, ya que algunos pueden actuar como oncogenes. Por ejemplo, los ARNmi conocidos como *miR-17-92* se amplifican en varios tipos tumorales y actúan sobre ARNm que codifican proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular (p. ej., el inhibidor de Cdk p21) o favorecen la apoptosis (como el miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 Bim)

Cancer genómico

Como ya se trató anteriormente, el desarrollo del cáncer es un proceso multietapa en el que las células sanas progresan de manera gradual hasta convertirse en células cancerosas. La secuencia completa de los procesos que se requieren para el desarrollo de cualquier cáncer humano todavía no se conoce, pero está claro que tanto la activación de los oncogenes como la inactivación de los genes supresores de tumores son pasos críticos en la iniciación y progresión del tumor. A la larga, el daño acumulado en varios genes es el responsable del aumento de la capacidad de proliferar, de invadir otros tejidos y de generar metástasis, característico de las células cancerosas.

Estudios recientes han usado la secuenciación genómica a gran escala para analizar sistemáticamente el conjunto de mutaciones presentes en los oncogenes y genes supresores de tumores encontrados en miles de cánceres individuales. Estos estudios de secuenciación a gran escala han identificado unos 150 genes mutados en cánceres humanos y que contribuyen al desarrollo del tumor. La mitad de estos genes son oncogenes de acción dominante y la mitad son genes supresores de tumores. Acorde con la naturaleza multifase del desarrollo tumoral, muchos cánceres contienen mutaciones de dos a seis genes diferentes que contribuyen al desarrollo del cáncer.

Aunque se ha identificado un gran número de oncogenes y genes supresores de tumores en los cánceres humanos, solo un subgrupo de estos está implicado en una proporción elevada de los cánceres individuales de un tipo determinado. Por ejemplo, la Figura 19.38 resume los resultados de los análisis de secuencia de múltiples cánceres de colon y mama distintos. En un análisis de más de 100 cánceres de colon, solo unos cuantos genes resul-

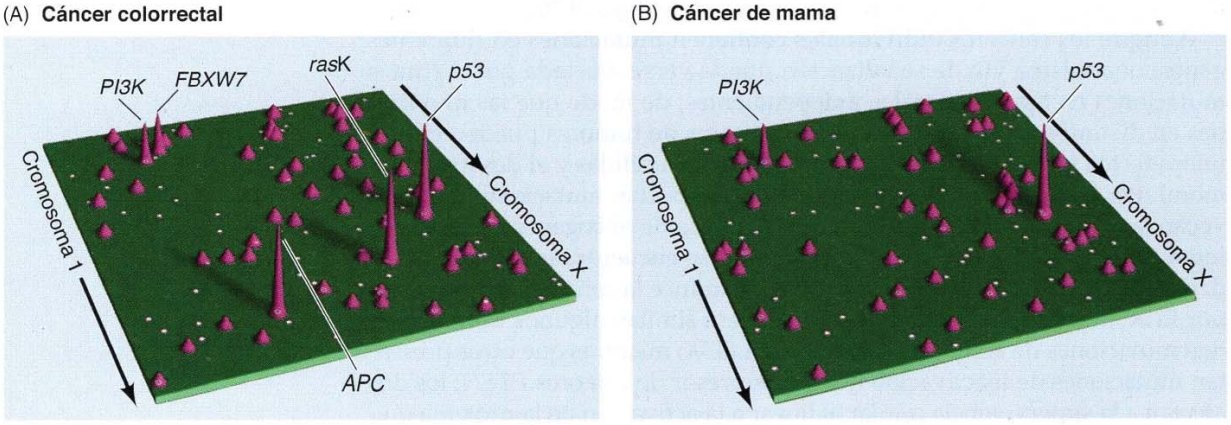


FIGURA 19.38 Alteraciones genéticas en los carcinomas colorrectales y mamarios. La frecuencia de mutaciones en genes asociados al desarrollo de carcinomas (A) colorrectales y (B) mamarios se representa con arreglo a la posición cromosómica de los genes, comenzando por el brazo corto del cromosoma 1 en el cuadrante superior izquierdo y continuando en el sentido de la flecha. Las posiciones que siguen al límite delantero de la gráfica continúan en la siguiente fila en el borde trasero y los cromosomas se alinean de extremo a extremo. El valor máximo de cada posición corresponde a la frecuencia de mutación del gen. (Tomado de L.D. Wood y cols., 2007, *Science* 318: 1108.)

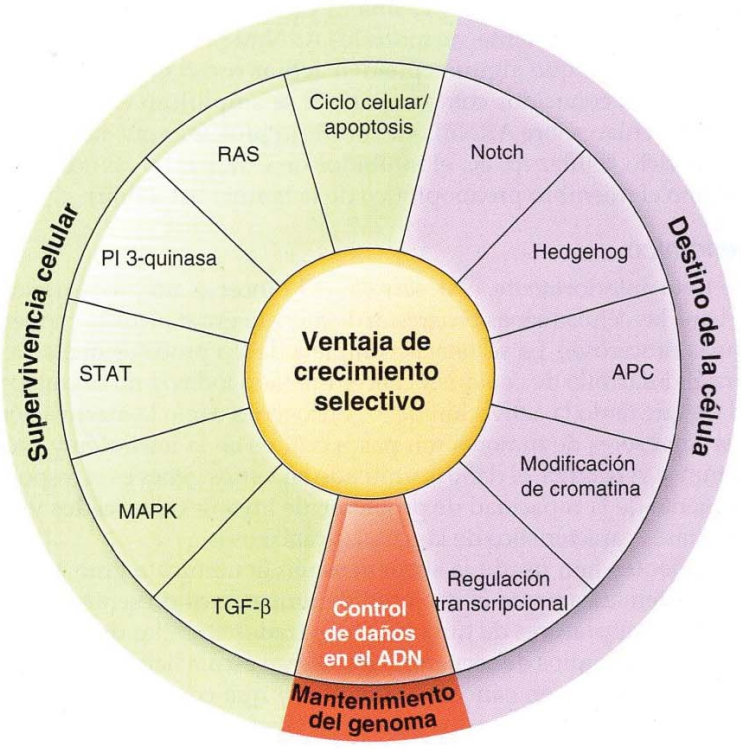


FIGURA 19.39 Vías afectadas por oncogenes humanos y genes supresores de tumores. Los oncogenes y los genes supresores de tumores mutados en los cánceres humanos pueden organizarse en 12 vías que confieren una ventaja de crecimiento selectiva al regular la supervivencia celular, el mantenimiento del genoma y el destino de la célula (De B. Vogelstein y cols., 2013, *Science* 339: 1546.)

taron mutados constantemente en una proporción elevada de los tumores individuales, incluidos los oncogenes *PI3K* y *ras*K los genes supresores de tumores *APC* y *p53* y el gen que codifica una ubiquitina ligasa que se dirige a la ciclina E para su degradación (FBXW7) (**Fig. 13.38A**). Se encontraron mutaciones en muchos otros genes con menos frecuencia, habitualmente en menos del 5% de los tumores. En los cánceres de mama se encontró un patrón de mutaciones similar, con mutaciones frecuentes en *PI3K* y *p53* y mutaciones menos frecuentes en muchos otros genes (**Fig. 19.38B**).

Aunque los cánceres individuales contienen mutaciones en diferentes genes, una misma vía de señalización puede verse afectada por distintas mutaciones en tipos tumorales independientes, de modo que las mutaciones en distintos oncogenes y genes supresores de tumores pueden ejercer unos efectos semejantes en comportamiento de la células y el desarrollo tumoral. Por ejemplo, algunos tumores de colon portan mutaciones que provocan la activación de un miembro de la familia de oncogenes *raf* (B-*raf*) en lugar de mutaciones de *ras*K. Dado que Raf se encuentra inmediatamente debajo de Ras, la activación de *ras*K o B-*raf* induce la señalización mediada por ERK en las células tumorales. De manera similar, algunos tumores tienen mutaciones de activación del oncogén *PI3K*, mientras que otros presentan mutaciones de inactivación del gen supresor de tumores *PTEN*; los dos afectan a la supervivencia celular al llevar a la activación de la proteína quinasa Akt. Por consiguiente, la acumulación de un gran número de mutaciones distintas en los tumores puede incidir en un número más reducido de vías complementarias encargadas de regular la proliferación, la supervivencia y la estabilidad de la célula (**Fig. 19.39**). Los daños acumulados en varios oncogenes y genes supresores de tumores en estas vías reguladoras distintas podría provocar la desaparición progresiva del control de la proliferación que hace posible el desarrollo de tumores.

◆ La cirugía profiláctica en mujeres que heredan genes BRCA mutados fue muy publicitada por la decisión de la actriz Angelina Jolie de someterse a una mastectomía doble preventiva en 2013.

Enfoques moleculares para el tratamiento del cáncer

Se ha aprendido mucho acerca de los defectos moleculares responsables del desarrollo de muchos cánceres humanos. Sin embargo, el cáncer es algo más que un tema de interés científico. Es una enfermedad terrible que causa la muerte de cerca de uno de cada cuatro americanos. Por tanto, aplicar nuestro conocimiento del cáncer para mejorar la prevención y el tratamiento del mismo representa un reto fundamental en la investigación actual y futura. Afortunadamente, los avances en la caracterización de la biología molecular del cáncer comienzan a contribuir al desarrollo de nuevos abordajes en su prevención y tratamiento, lo que en último término permitirá hacer frente a la enfermedad de una manera más adecuada.

Prevención y detección precoz

La manera más efectiva de hacer frente al cáncer sería evitar el desarrollo de la enfermedad. La segunda mejor manera, pero también efectiva, sería detectar de manera fiable el tumor antes de que alcanzara la etapa de carácter maligno, de tal manera que pudiera ser tratado. Muchos cánceres se pueden curar mediante tratamientos locales, como la cirugía o la irradiación, siempre y cuando se detecten antes de que se propaguen por metástasis por todo el cuerpo. Por ejemplo, las etapas premalignas del cáncer de colon (adenomas) se suelen curar por completo mediante procedimientos quirúrgicos menores (**Fig. 19.40**). La tasa de curación de los carcinomas tempranos que todavía permanecen en su lugar de origen también es elevada, menos del 90%. Sin embargo, la tasa de supervivencia disminuye a cerca del 70% para aquellos pacientes cuyo cáncer se ha difundido a los tejidos adyacentes y a los nódulos linfáticos, y es alrededor del 13% para aquellos pacientes con cáncer de colon metastásico. Por tanto, la detección precoz del cáncer es un factor determinante en las consecuencias de la enfermedad.

La principal aplicación de la biología molecular a la prevención y a la detección precoz consiste en identificar a aquellos individuos que tienen una tendencia hereditaria a desarrollar el cáncer. Esta tendencia hereditaria se debe a mutaciones en los genes supresores de tumores, en al menos algún oncogén (*ret* y *cdk4*), así como en los genes de reparación del ADN, como en los genes reparadores *BRCA1* y *BRCA2* de bases desapareadas; esta última mutación es la responsable del cáncer de colon no polipoide hereditario (véase Medicina Molecular en el Cap. 7). Las mutaciones en estos genes se pueden detectar mediante una prueba genética, lo que permite identificar a los individuos de alto riesgo antes de que la enfermedad se desarrolle.

Algunos pacientes con riesgo elevado de sufrir cáncer, por ejemplo los poseedores de mutaciones hereditarias de BRCA1 o BRCA2, pueden optar por cirugía profiláctica para prevenir el desarrollo del cáncer. Además, en el ámbito de la planificación familiar, el seguimiento riguroso de aquellos individuos de alto riesgo permitirá la detección precoz y un tratamiento más efectivo de algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, los adenomas de colon se pueden detectar por colonoscopia y se pueden extirpar antes de que se conviertan en tumores malignos. Los pacientes con poliposis adenomatosa familiar (debido a mutaciones hereditarias en el gen supresor de tumores *APC*) suelen desarrollar cientos de adenomas en sus primeros 20 años de vida, por lo que el colon de estos pacientes se suele extirpar antes de que alguno de estos pólipos progrese hasta un estado de tumor maligno. Sin embargo, los pacientes con cáncer de colon no polipoide hereditario desarrollan un menor número de pólipos en momentos posteriores de la vida, por lo que se pueden beneficiar de la colonoscopia rutinaria y de determinadas drogas, como por ejemplo las drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAID), que inhiben el desarrollo del cáncer de colon.

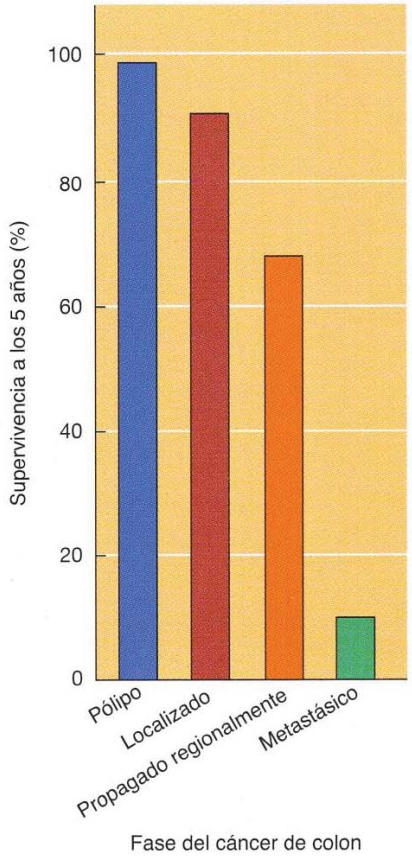


FIGURA 19.40 Tasas de supervivencia de pacientes con carcinoma de colon. Se muestran las tasas de supervivencia durante cinco años de pacientes a los que se les diagnosticó adenomas (pólipos), carcinomas localizados en su lugar de origen, carcinomas que se habían propagado a tejidos adyacentes y nódulos linfáticos, y carcinoma metastásico. (Datos de American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2015*.)

La herencia de cánceres debidos a alteraciones en genes conocidos es un hecho poco frecuente, constituyendo cerca del 5% de la incidencia total del cáncer. El tipo de cáncer con una tendencia hereditaria más común es el cáncer de colon no polipoide hereditario, que contabiliza cerca del 15% de los cánceres de colon y del 1% al 2% de todos los cánceres en Estados Unidos. Las mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* también son bastante comunes, y contabilizan el 5% de todos los cánceres de mama. Sin embargo, algunos genes que producen un aumento de la tendencia a contraer cáncer podrían intervenir en el desarrollo de un grupo más amplio de tumores malignos frecuentes de adultos. La identificación de estos genes que confieren susceptibilidad al cáncer constituye una empresa importante con consecuencias prácticas evidentes. La identificación fehaciente de los individuos susceptibles, seguida de unas medidas de detección adecuadas, podrían en último término disminuir de manera importante la mortalidad por cáncer.

Tratamiento

Sin embargo, la cuestión fundamental es saber si el descubrimiento de los oncogenes y de los genes supresores de tumores dará lugar al desarrollo de nuevos medicamentos que actúen selectivamente contra las células cancerosas. La mayoría de los medicamentos que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer, bien dañan el ADN, o bien inhiben la replicación del ADN. Por tanto, estos medicamentos no sólo son tóxicos para las células cancerosas, sino también para las células sanas, especialmente para aquellas células sanas que experimentan una división celular rápida (p. ej., células hematopoyéticas, células epiteliales del tracto gastrointestinal y células del folículo piloso). La acción de los medicamentos anticancerosos contra estas poblaciones de células sanas es la responsable de la mayor parte de la toxicidad asociada a estos medicamentos, y limita su efectividad en el tratamiento del cáncer.

Un abordaje alternativo a la terapia del cáncer es la utilización de drogas que inhiben el crecimiento del tumor interfiriendo con la angiogénesis (la formación de los vasos sanguíneos), en lugar de actuar directamente contra las células cancerosas. Como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, se necesita que se formen nuevos vasos sanguíneos para suministrar el oxígeno y los nutrientes que se requieren para el crecimiento del tumor. Por tanto, para el desarrollo del tumor es fundamental promover la angiogénesis, y las células tumorales secretan determinados factores de crecimiento, incluido el VEGF, que estimulan la proliferación de las células endoteliales de los capilares, lo que origina el crecimiento de nuevos capilares en el tumor (véase Fig. 18.15). La importancia de la angiogénesis la reconoció por primera vez Judah Folkman en 1971, y las investigaciones llevadas a cabo por Folkman y cols. han conducido al desarrollo de nuevos medicamentos (endostatina y angiostatina) que inhiben la angiogénesis bloqueando la proliferación de las células endoteliales. Puesto que estos medicamentos actúan de manera específica inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos, son mucho menos tóxicos para las células sanas que los agentes anticancerosos estándar. Los inhibidores de la angiogénesis han dado resultados muy prometedores en pruebas llevadas a cabo con animales, y actualmente están siendo sometidos a ensayos clínicos para evaluar su efectividad contra los cánceres humanos. En 2004, resultados clínicos positivos dieron lugar a que la Administración de Alimentos y Medicamentos Americana (FDA: *Food and Drug Administration*) aprobase el uso del primer inhibidor de la angiogénesis, un anticuerpo monoclonal contra VEGF, para el tratamiento del cáncer de colon. Este anticuerpo monoclonal también se está utilizando actualmente en glioblastomas, cánceres de pulmón y de riñón. Además, dos pequeñas moléculas inhibidoras del receptor del VEGF (sunitinib y sorafenib) han sido aprobadas para el tratamiento del cáncer renal.

La estrategia más prometedora para lograr tratamientos anticancerosos más selectivos es el desarrollo de fármacos dirigidos específicamente a los oncogenes que producen el crecimiento tumoral. Desgraciadamente, desde el punto de vista del tratamiento del cáncer, los oncogenes no son exclusivos de las células tumorales. Puesto que los proto-oncogenes desempeñan un papel importante en las células sanas, es probable que los inhibidores generales de la función o de la expresión de los oncogenes actúen contra las células sanas así como contra las células tumorales. Por tanto, la utilidad de los oncogenes como dianas de las drogas anticancerosas no resulta evidente, pero algunos avances prometedores indican que puede ser posible desarrollar terapias selectivas basadas en los oncogenes (**Tabla 19.6**).

El primer régimen terapéutico dirigido contra un oncogén específico se utiliza para tratar la leucemia promielocítica aguda. Esta leucemia se caracteriza por una translocación cromosómica en la que el gen que codifica el receptor del ácido retinoico (*RARα*) se une a otro gen (*PML*) para dar lugar al oncogén *PML/RARα*. Se cree que funciona como un represor de la transcripción que bloquea la diferenciación celular. Sin embargo, estas células leucémicas se diferencian en respuesta al tratamiento con dosis altas de ácido retinoico, que parece que supera el efecto inhibidor de la proteína oncogénica PML/RARα. Este tratamiento con el ácido retinoico provoca la remisión de la leucemia en la mayoría de los pacientes, aunque esta respuesta favorable es temporal, y los pacientes vuelven a recaer. Sin embargo, el tratamiento combinado con ácido retinoico y con agentes quimioterapéuticos estándar reduce de manera significativa la incidencia de la recaída, por lo que la utilización del ácido retinoico resulta beneficiosa en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. La actividad terapéutica del ácido retinoico se detectó antes de que fuera identificado el oncogén *PML/RARα*, por lo que su efectividad contra las células leucémicas que expresan esta proteína oncogénica se descubrió por casualidad, en vez de mediante un diseño racional del medicamento. De todas maneras, la utilización del ácido retinoico en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda proporciona el primer ejemplo de un medicamento clínicamente útil dirigido contra una proteína oncogénica.

La herceptina, un anticuerpo monoclonal frente a la proteína oncogénica ErbB-2, fue la primera droga desarrollada frente a un oncogén específico que consiguió la aprobación de la FDA para su uso clínico en el tratamiento del cáncer. La proteína ErbB-2 se sobreexpresa en aproximadamente el 25% al 30% de los cánceres de mama como resultado de la amplificación

TABLA 19.6 Terapias representativas dirigidas a oncogenes

Fármaco	Proteína diana	Tipos de tumor
Ácido retinoico	*PML/RARα*	Leucemia promielocítica aguda
Herceptina	*ErbB-2*	Cáncer de mama
Erbitux	*ErbB*	Cáncer colorrectal
Imatinib	*Abl*	Leucemia mieloide crónica
	Kit	Tumores estromales gastrointestinales
	PDGFR	Tumores estromales gastrointestinales, leucemia mielomonocítica crónica, síndrome hipereosinofílico, dermatofibrosarcoma protuberante
Gefitinib	*ErbB*	Cáncer de pulmón
Erlotinib	*ErbB*	Cáncer de pulmón
Vemurafenib	B-*Raf*	Melanoma
Crizotinib	Alk	Cáncer de pulmón
Vismodegib	SMO	Cáncer de piel (carcinoma de células basales)
Trametinib	MEK	Melanoma
Idelalisib	PI3K	Leucemia linfocítica crónica
Everolimus	mTOR	Carcinoma de célular renales, cáncer de mama

del gen *erb*B-2. En primer lugar se encontró que un anticuerpo frente al dominio extracelular de ErbB-2 (un receptor tirosina quinasa) inhibía la proliferación de células tumorales en las que se sobreexpresaba ErbB-2. Estos resultados llevaron al desarrollo y ensayo clínico de la Herceptina, que se encontró que reducía significativamente el crecimiento tumoral y prolongaba la supervivencia del paciente, en ensayos clínicos que incluían a más de 600 mujeres con cáncer de mama metastásico en el que se sobreexpresaba la proteína ErbB-2. Basándose en estos resultados, la Herceptina fue aprobada por la FDA en 1998 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico que expresase niveles elevados de ErbB-2. Erbitux, un anticuerpo monoclonal contra el receptor de EGF (la proteína del oncogén ErbB-2), también fue aprobado por la FDA en el 2004 para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado y, más recientemente, en tumores de cabeza y cuello.

El uso terapéutico de anticuerpos monoclonales está limitado a las dianas extracelulares, como los factores de crecimiento o los receptores de superficie celulares. Un área de aplicación más amplia de desarrollo de principios activos es la identificación de inhibidores de proteínas oncogénicas de pequeño tamaño molecular, incluyendo las proteínas quinasas que juegan papeles clave en la señalización de la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. El avance pionero en esta área fue el desarrollo de un inhibidor selectivo de la tirosina quinasa Bcr/Abl, que es generado por la translocación cromosómica Philadelphia en la leucemia mieloide crónica (CML) (véase Fig. 19.22). Brian Druker y cols. desarrollaron un inhibidor potente y específico de la proteína quinasa Bcr/Abl y demostraron que este compuesto (denominado imatinib o Gleevec) bloquea de forma eficaz la proliferación de las células de leucemia mieloide crónica. Basándose en estos resultados, un ensayo clínico del imatinib fue iniciado en 1998. Las respuestas a imatinib fueron notables, y el principio activo tenía efectos secundarios mínimos. El llamativo éxito del imatinib en estos estudios clínicos sirvió como base para la rápida aprobación por la FDA en 2001 de su uso para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica. Desde entonces, el uso de imatinib ha reducido la mortalidad de la leucemia mieloide crónica en un 80%, aproximadamente (**Fig. 19.41**). A pesar de que algunos pacientes recaen y desarrollan resistencia frente al principio activo, el imatinib es indudablemente una terapia altamente eficaz para esta leucemia. Interesantemente, la resistencia a imatinib en la mayoría de los casos resulta de mutaciones en el dominio quinasa de la proteína Bcr/Abl que impiden la unión del imatinib. Mediante el análisis de estos mutantes resistentes, ha sido posible diseñar nuevos inhibidores, que están

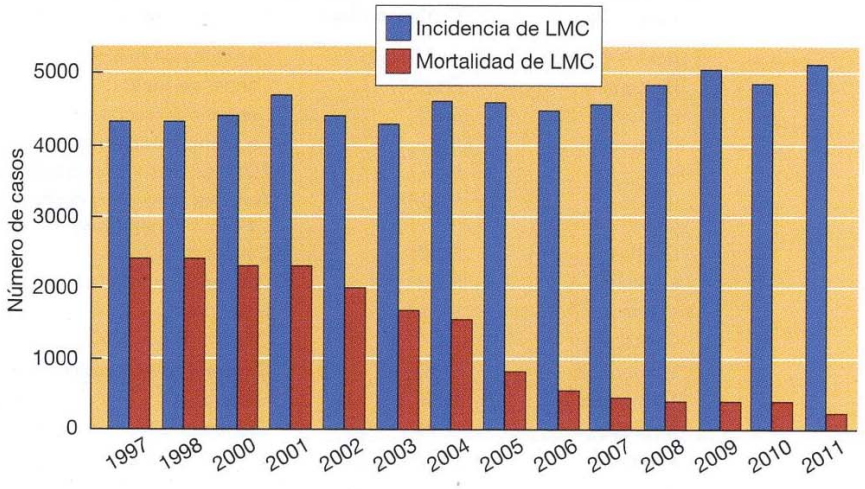
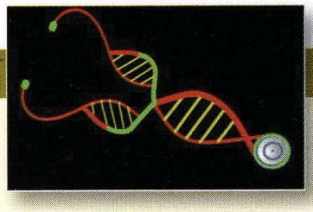


FIGURA 19.41 Efecto de imatinib en la mortalidad de leucemia crónica mieloide. El número anual de casos y muertes de la leucemia crónica mieloide (CML) en los EE. UU. está representado a partir de 1997 hasta 2011. La incidencia de la enfermedad no se ha cambiado considerablemente, pero la mortalidad ha disminuido al 80 %, ya que imatinib fue aprobado para el tratamiento en 2001. (From W. R. Sellers, 2011, *Cell* 147: 26.)



MEDICINA MOLECULAR

Imatinib: Tratamiento del cáncer dirigido contra el oncogén *bcr/abl*

Enfermedad

La leucemia mieloide crónica (LMC) constituye aproximadamente el 12% de las leucemias en adultos. En 2015, se calcula que se diagnosticarán unos 6.700 casos de LMC en EE. UU., y que cerca de 1.100 personas fallecerán por esta enfermedad.

La LMC se origina a partir de una célula madre pluripotencial en la médula ósea. Es una enfermedad de desarrollo lento, que se divide clínicamente en dos etapas: la fase crónica y la crisis blástica. La fase crónica de la LMC puede persistir durante años y se asocia con una sintomatología mínima. Finalmente, sin embargo, los pacientes progresan hacia un estado agudo de la enfermedad que pone en peligro su vida, conocido como crisis blástica. La crisis blástica se caracteriza por la acumulación de grandes números de células leucémicas que proliferan rápidamente, denominadas blastos. Antes del desarrollo de imatinib, los pacientes que sufren la crisis blástica se tratan con drogas quimioterapéuticas estándar, que pueden inducir una remisión a la fase crónica de la enfermedad. También se empleaba la quimioterapia habitual en la fase crónica de la LMC, pero generalmente no consigue eliminar las células leucémicas. La LMC también puede tratarse mediante un trasplante de células madre de la médula ósea, lo que puede resultar curativo en aproximadamente la mitad de los pacientes en la fase crónica de la enfermedad.

Base molecular y celular

La activación del oncogén *abl* por la translocación desde su locus normal en el cromosoma 9 al cromosoma 22 es un suceso altamente reproducible en la LMC, ocurriendo en el 95% de estas leucemias. Esta translocación resulta en la formación de una fusión entre el gen *abl* y el gen *bcr* del cromosoma 22, dando lugar al oncogén *bcr/abl*. El oncogén expresa una proteína de fusión Bcr/Abl en la que la secuencia de aminoácidos Bcr sustituye al primer exón de Abl (véase Fig. 19.22). La proteína Bcr/Abl es una proteína-tirosina quinasa constitutivamente activa, que desencadena una leucemia mediante la activación de una serie de vías de señalización.

Puesto que la activación del oncogén *bcr/abl* es un evento tan reproducible en el desarrollo de la LMC, parecía ser un buen candidato contra el que desarrollar un inhibidor selectivo de tirosina-quinasas que podría ser de utilidad clínica. Estos estudios dieron lugar al desarrollo del imatinib (también conocido como Gleevec) como la primera droga terapéutica diseñada con éxito como inhibidor selectivo de una proteína oncogénica.

Prevención y tratamiento

El desarrollo del imatinib empezó con la identificación de la 2-fenilo-aminopirimidina como un inhibidor inespecífico de proteínas quinasas. A continuación, fueron sintetizados una serie de compuestos relacionados, y fueron optimizados en base a su actividad frente a distintas dianas, incluyendo la tirosina quinasa Abl. Entre muchos compuestos analizados en estas investigaciones, se encontró que el imatinib era un inhibidor potente y específico de Abl, y de otras dos proteína-tirosina quinasas, el receptor del factor de crecimiento plaquetario y c-Kit. Estudios sucesivos, demostraron que el imatinib inhibía específicamente la proliferación de células transformadas por oncogenes *bcr/abl*, incluyendo células de pacientes con LMC, en cultivo. Además, el imatinib impedía la formación de tumores por parte de células transformadas con *bcr/abl* en ratones. Por el contrario, las células normales o células transformadas con otros oncogenes, no eran afectadas por el imatinib, demostrando su especificidad frente a la tirosina quinasa Bcr/Abl.

Basándose en estos resultados, se inició la fase I del ensayo clínico de imatinib en junio de 1998. Los resultados fueron sorprendentemente positivos. De los 54 pacientes en fase crónica tratados con imatinib, 53 respondieron a la droga. Es más, la respuesta al imatinib se observó en más de la mitad de los pacientes en crisis blástica tratados. El éxito de estos estudios iniciales incitó una fase II expandida que incluía a más de 1.000 pacientes. Estos estudios confirmaron los resultados prometedores de la fase I, donde el 95% de los pacientes en fase crónica y aproximadamente el 50% de los pacientes en crisis blástica, respondieron al imatinib. Además, al contrario que las drogas quimioterapéuticas convencionales, el imatinib poseía efectos secundarios mínimos. Estos estudios clínicos claramente demostraron que el imatinib es una terapia altamente eficaz para la LMC, y dio lugar a una aprobación acelerada del imatinib por parte de la FDA en mayo del 2001 —un hito en la traducción de la ciencia básica en práctica clínica. Desde que fue aprobado en 2001, el uso de imatinib ha reducido la mortalidad de la LMC en un 80%, aproximadamente.

Estructura cristalina del dominio catalítico de Abl formando un complejo con un derivado del imatinib. (De T. Schindler y cols. Science 289: 1938.)

Referencia

Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541-8546.

actualmente en ensayos clínicos para determinar su eficacia contra leucemias que se han hecho resistentes al imatinib.

El imatinib es también un potente inhibidor del receptor de PDGF y de las proteína-tirosina quinasas Kit, y se ha demostrado que resulta una terapia eficaz para tumores en los que los genes que codifican para estas proteína quinasas son oncogenes activados mutacionalmente. *Kit* es activado en aproximadamente un 90% de los tumores de estroma gastrointestinal, que son tumores del tejido conectivo estromal del estómago e intestino delgado. Muchos de los tumores de estroma gastrointestinal que no poseen mutaciones activadoras de Kit, poseen en su lugar mutaciones activadoras del receptor de PDGF. Como consecuencia, los tumores de estroma gastrointestinal responden con fuerza al imatinib. Adicionalmente, el imatinib es activo frente a otros tres tipos de tumores en los que el receptor de PDGF está activado como oncogén, incluyendo la leucemia mielomonocítica crónica en el que es activado mediante fusión con el factor de transcripción Tel (véase Fig. 19.24).

Dos inhibidores de pequeño tamaño molecular del receptor del EGF (gefitinib y erlotinib) han mostrado recientemente una llamativa actividad contra un subgrupo de cánceres de pulmón en los que el receptor de EGF está activado por mutaciones puntuales. Resulta notable que la idea de tratar cánceres de pulmón con gefitinib fue el hecho de que estos inhibidores de EGF están sobreexpresados en la mayoría de los cánceres de pulmón, en lugar del hecho de que pueden ser activados mediante mutaciones en oncogenes. Al contrario que la eficacia general del imatinib frene a la leucemia mieloide crónica, los estudios clínicos indicaron que gefitinib o erlotinib fueron eficaces en sólo un 10% de los pacientes de cáncer de pulmón, aunque las respuestas en estos pacientes era bastante dramática. Un avance importante se hizo en 2004 cuando dos grupos de investigadores encontraron que el subgrupo de cánceres de pulmón que respondían a gefitinib eran estos inhibidores en los que las mutaciones puntuales resultaban en la activación constitutiva del receptor tirosina quinasa para EGF. Estos resultados indicaban que la inhibición del receptor de EGF era un tratamiento efectivo para aquellos tumores en los que había sido mutado para actuar como un oncogén pero en aquellos que expresaban la proteína normal. Hace poco tiempo, se ha encontrado que un inhibidor de otra tirosina-cinasa (Alk) es eficaz en un subgrupo determinado de cánceres de pulmón en los que la Alk ha sido activada como oncogén por translocación. Los inhibidores de tirosina quinasa adicionales son eficaces frente a tumores en los que las tirosina quinasas Met y Ret son oncogenes activados.

Un inhibidor de B-Raf (vemurafenib) ha tenido resultados llamativos en el tratamiento del melanoma. La B-Raf está activada como oncogén en cerca del 60% de los melanomas humanos debido a una mutación que sustituye la valina de la posición 600 por ácido glutámico. El vemurafenib tiene más afinidad por las proteínas B-Raf con ácido glutámico en esta posición, de modo que inhibe selectivamente los proteínas oncogénicas B-Raf mutados y es muy eficaz en los melanomas que tienen esta mutación. Fue aprobado por la FDA para el tratamiento de los melanomas avanzados en 2011. Otros fármacos dirigidos a oncogenes que han sido aprobados para el tratamiento contra el cáncer son los inhibidores de MEK, PI 3-quinasa y mTOR (véase Fig. 16.32); asimismo se aprobó un inhibidor de la señalización de Hedgehog para el tratamiento de los carcinomas de células basales con mutaciones oncogénicas de Smoothened, el receptor de Hedgehog (véase Fig. 16.41).

La eficacia de los inhibidores de oncogenes en el tratamiento del cáncer respalda la hipótesis de que los tumores con oncogenes activados son especialmente susceptibles a los inhibidores de estos oncogenes. Esto concuerda asimismo con distintos experimentos en modelos animales. La sensibilidad

de los tumores a la inhibición de oncogenes activados se ha denominado **adicción oncogénica**. Se cree que un oncogén activado se convierte en uno de los principales motores en la célula tumoral, de modo que otras vías de señalización en la célula tumoral se hacen secundarias. Como consecuencia, la proliferación y supervivencia de una célula tumoral puede convertirse y hacerse dependiente de la actividad continuada del oncogén, mientras que las células normales tienen vías de señalización alternativas que pueden compensar si alguna de las vías es bloqueada. Una célula cancerosa con un oncogén activado puede, por tanto, ser sensible selectivamente a la inhibición de esa proteína codificada por el oncogén.

A pesar de las respuestas inicialmente importantes de los tumores a las terapias dirigidas a oncogenes, la eficacia de muchos de estos fármacos está limitada por el desarrollo de resistencias. Mientras el imatinib es eficaz para el tratamiento de larga duración de la leucemia mieloide crónica (como se ilustra en la Fig. 19.41), la mayor parte de los pacientes con cáncer de pulmón o melanoma sólo responden a inhibidores del receptor EGF o B-Raf durante un año, aproximadamente, antes de que se desarrolle una resistencia. Esta resistencia puede proceder de varios mecanismos, entre ellos mutaciones en la quinasa objeto, la activación de otras tirosina quinasas y la activación de vías oncogénicas posteriores. Por ejemplo, la activación oncogénica de Ras o PI 3-quinasa puede producir resistencia a los inhibidores de receptores EGF. Los intentos por prevenir el desarrollo de resistencia a estos fármacos, posiblemente mediante la combinación de múltiples terapias dirigidas, se sitúa así en primera línea de las investigaciones en curso.

Aunque queda mucho por hacer, la eficacia de los fármacos descritos indica claramente que la explotación continuada de los oncogenes como dianas para el desarrollo de principios activos tiene el potencial de conducirnos hacia una nueva generación de fármacos que actúen selectivamente contra las células cancerosas. La aparente dependencia de las células de cáncer de oncogenes mutacionalmente activados ofrece la promesa de que el uso de principios activos dirigidos contra los oncogenes en combinación con la secuenciación del genoma tumoral de los pacientes individuales puede dar lugar a grandes avances en el tratamiento del cáncer personal. A pesar de que el eventual impacto de la biología molecular sobre el tratamiento del cáncer sigue estando en el futuro está claro que el diseño racional de principios activos dirigidos contra proteínas oncogénicas específicas jugará un papel importante.

RESUMEN

Desarrollo y causas del cáncer

Tipos de cáncer: El cáncer se debe a la proliferación incontrolada de cualquier tipo de célula. La distinción más importante, para el paciente, es entre tumores benignos, que permanecen en el lugar de origen, y tumores malignos, que pueden invadir el tejido circundante sano y diseminarse por el organismo.

Ver Animación 19.1 y Vídeo 19.1

cáncer, tumor, tumor benigno, tumor maligno, metástasis, carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma

Desarrollo del cáncer: Los tumores se desarrollan a partir de una única célula alterada que comienza a proliferar de manera anormal. Mutaciones adicionales darán lugar a la selección de aquellas células con una mayor capacidad de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis.

Ver Vídeo 19.2

iniciación del tumor, progresión del tumor, selección clonal, adenoma, pólipo

Causas del cáncer: La radiación y muchos otros carcinógenos químicos actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. Otros carcinógenos químicos contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular. Los virus también causan cáncer en humanos y en otras especies.

carcinógeno, promotor tumoral

PALABRAS CLAVE

RESUMEN

Propiedades de las células cancerosas: La proliferación incontrolada de las células cancerosas se refleja en que tienen poca necesidad de factores de crecimiento extracelulares, y en la ausencia de la inhibición por contacto célula-célula. Muchas células cancerosas también se diferencian de manera defectuosa, lo que está de acuerdo con su proliferación continua *in vivo*. La incapacidad característica de las células cancerosas de sufrir apoptosis también contribuye de una manera importante al desarrollo del tumor.

Ver Animación 19.2

PALABRAS CLAVE

inhibición dependiente de la densidad, inhibición por contacto. estimulación autocrina del crecimiento, inhibición por contacto, angiogénesis, muerte celular programada, apoptosis

Transformación de las células en cultivo: El desarrollo de ensayos de transformación celular *in vitro*, ha permitido estudiar la conversión de células sanas en células tumorales, en cultivos celulares.

transformación celular

Virus tumorales

Virus de la hepatitis B y C: Los virus de la hepatitis B y C pueden causar cáncer hepático en humanos.

virus tumoral, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C

Virus tumorales de ADN pequeño: Los papilomavirus causan varios tumores, como el carcinoma de cuello uterino humano, y el poliomavirus de las células de Merkel origina un cáncer de piel humano infrecuente. Aunque otros virus tumorales de ADN pequeño no provocan cáncer en las personas, sí son modelos importantes para estudiar la biología molecular de la transformación celular. Las proteínas transformadoras de estos virus interaccionan a menudo con las proteínas celulares supresoras de tumores Rb y p53.

polyomavirus, papillomavirus, adenovirus, papillomavirus de la célula de Merkel

Herpesvirus: Los herpesvirus, que están entre los virus animales más complejos, provocan el cáncer en varias especies, incluido el hombre.

herpesvirus, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, virus de Epstein-Barr

Retrovirus: Los retrovirus causan el cáncer en el hombre y en otros animales. Algunos retrovirus tienen genes específicos responsables de inducir la transformación celular, y a partir de estudios realizados con estos retrovirus altamente oncogénicos se han caracterizado oncogenes virales y celulares.

retrovirus, virus del sarcoma de Rous (RSV)

Oncogenes

Oncogenes retrovíricos: El primer oncogén identificado fue el gen *src* del RSV. Estudios posteriores han identificado más de dos docenas de oncogenes distintos en diferentes retrovirus.

oncogén, *src*, *ras*, *raf*

Proto-oncogenes: Los oncogenes de los retrovirus se originaron a partir de genes similares de células sanas denominados proto-oncogenes.

proto-oncogén

Oncogenes en el cáncer en el hombre: En el cáncer en el hombre, diversos oncogenes se activan a partir de mutaciones puntuales, reordenamientos del ADN, y amplificaciones. Algunos de estos oncogenes de tumores humanos, como los genes *ras*, son los homólogos celulares de aquellos oncogenes que se describieron por primera vez en los retrovirus.

c-*myc*, *abl*, *erb*B-2

Funciones de los productos oncogénicos: La mayoría de las proteínas oncogénicas intervienen como componentes de las vías de señalización que estimulan la proliferación celular. El gen que codifica la ciclina D1 y Cdk4 también es un oncogén potencial, que estimula la progresión del ciclo celular. Otras proteínas oncogénicas interfieren con la diferenciación celular, y los oncogenes que codifican la PI 3-quinasa, Akt y Bcl-2 inhiben la apoptosis.

Fos, Jun, *CCND*1, ErbA, PML/RARα, PI 3-quinasa, Akt, Bcl-2

Genes supresores de tumores

Identificación de los genes supresores de tumores: A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores inhiben el desarrollo del tumor. El prototipo de un gen supresor de tumores, *Rb*, se identificó a partir de los estudios sobre la herencia del retinoblastoma. La pérdida o la inactivación por mutación de *Rb* y de otros genes supresores de tumores, como *p53*, contribuye a que se desarrollen diversos tipos de cáncer en el hombre.

gen supresor de tumores, *Rb*, *p53*

Ver Vídeo 19.2

RESUMEN

Funciones de los productos de los genes supresores de tumores: Las proteínas codificadas por la mayoría de los genes supresores de tumores intervienen como inhibidores de la proliferación o de la supervivencia celular. Las proteínas Rb, INK4, y p53 son reguladores negativos de la progresión del ciclo celular. Además, p53 se requiere para la apoptosis inducida por lesión del ADN y por otros estímulos, por lo que su inactivación contribuye a estimular la supervivencia de la célula tumoral. Algunos genes, como *BRCA1* y *BRCA2*, actúan para mantener la estabilidad genómica en lugar de influenciar directamente la proliferación celular.

Genómica del cáncer: Las mutaciones en los oncogenes y en los genes supresores de tumores contribuyen al desarrollo progresivo de los cánceres en el hombre. Se considera que la acumulación de los daños en varios de estos genes origina la alteración de la proliferación, diferenciación y supervivencia que caracteriza a la célula cancerosa. Los numerosos genes diferentes que pueden contribuir al desarrollo de tumores influyen en las actividades de un número de vías de regulación celular relativamente bajo.

Enfoques moleculares para el tratamiento del cáncer

Prevención y detección precoz: Muchos cánceres se pueden curar si se detectan en una etapa temprana del desarrollo del tumor. Las pruebas genéticas para identificar a aquellos individuos que tengan una tendencia hereditaria a desarrollar un cáncer, pueden permitir una detección precoz y un tratamiento más eficaz de los individuos de alto riesgo.

Tratamiento: El desarrollo de drogas dirigidas contra oncogenes puede conducir a que se descubran nuevos agentes terapéuticos que actúen de manera selectiva contra las células cancerosas.

PALABRAS CLAVE

PTEN, gen de estabilidad

adicción oncogénica

Preguntas

1. ¿En qué difiere un tumor benigno de un tumor maligno?
2. ¿Cuál es el papel de la selección clonal en el desarrollo del cáncer?
3. ¿Cómo aumentan los estrógenos el riesgo de padecer un cáncer?
4. ¿Cómo contribuye la estimulación autocrina del crecimiento a la progresión de los tumores?
5. ¿Qué propiedades de las células cancerosas les confieren la capacidad de metastatizar?
6. ¿Por qué los pacientes de SIDA tienen una elevada incidencia de algunos tipos de cáncer?
7. ¿Cómo puede convertirse un protooncogén en un oncogén sin un cambio o una mutación de su secuencia codificante? Explica dos formas en las que podría ocurrir.
8. ¿Qué efecto podría esperarse de la sobreexpresión del producto del gen supresor de tumores *INK4* en células tumorales en las que se ha inactivado *Rb* mediante una mutación?
9. ¿Qué tumores consideras que serían más sensibles al tratamiento con radiación —los tumores con el gen *p53* salvaje *(wild-type)* o con el gen *p53* mutado?
10. ¿Cuál es el modo de acción del imatinib? ¿Cómo desarrollan algunos tumores la resistencia a este principio activo?
11. ¿Qué es la «adicción oncogénica» y por qué es importante este concepto para la selección de dianas moleculares para la terapia contra el cáncer?
12. ¿Podría una mutación de activación de Raf conferir resistencia a un inhibidor de la proteína quinasa MEK?

Bibliografía

Desarrollo y causas del cáncer

Adams, J. M. and A. Strasser. 2008. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 68: 4018–4021. [R]

Colditz, G. A., T. A. Sellers and E. Trapido. 2006. Epidemiology—Identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Rev. Cancer* 6: 75–83. [R]

Elinav, E., R. Nowarski, C. A. Thaiss, B. Hu, C. Jin and R. A. Flavell. 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature Rev. Cancer.* 13: 759–771. [R]

Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144: 646–674. [R]

Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24: 2463–2479. [R]

Nowell, P. C. 1986. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 46: 2203–2207. [R]

Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390–395. [R]

Raff, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397–400. [R]

Rosen, J. M. and C. T. Jordan. 2009. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324: 1670–1673. [R]

Tenen, D. G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Rev. Cancer* 3: 89–101. [R]

Vanharanta, S. and J. Massagué. 2013. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell* 24: 410–421. [R]

Wan, L., K. Pantel and Y. Kang. 2013. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nature Med.* 19: 1450–1464. [R]

Virus tumorales

Boshoff, C. and R. Weiss. 2002. AIDS-related malignancies. *Nature Rev. Cancer* 2: 373–382. [R]

Bouchard, M. J. and R. J. Schneider. 2004. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* 78: 12725–12734. [R]

Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Varmus, eds. 1997. *Retroviruses.* Woodbury, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Damania, B. 2004. Oncogenic -herpesviruses: Comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 656–668. [R]

Ganem, D. 2006. KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1: 273–296. [R]

Grassmann, R., M. Aboud and K.-T. Jeang. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24: 5976–5985. [R]

Helt, A.-M. and D. A. Galloway. 2003. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 24: 159–169. [R]

Matsuoka, M. and K.-T. Jeang. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Rev. Cancer* 7: 270–280.[R]

Mesri, E. A., E. Cesarman and C. Boshoff. 2010. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nature Rev. Cancer* 10: 707–719. [R]

Moody, C. A. and L. A. Laimins. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Rev. Cancer* 10: 550–560. [R]

Moore, P. S. and Y. Chang. 2010. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature Rev. Cancer* **10: 878–889. [R]**

Polk, D. B. and R. M. Peek Jr. 2010. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Rev. Cancer* 10: 403–414. [R]

Saenz-Robles, M. T., C. S. Sullivan and J. M. Pipas. 2001. Transforming functions of simian virus 40. *Oncogene* 20: 7899–7907. [R]

Young, L. S. and A. B. Rickinson. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Rev. Cancer.* 4: 757–768. [R]

zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* 2: 342–350. [R]

Oncogenes

Albertson, D. G. 2006. Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* 22: 447–455. [R]

Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411: 355–365. [R]

Clevers, H. 2006. Wnt/ -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–479. [R]

Dang, C. V. 2012. *MYC* on the path to cancer. *Cell* 149: 22–35. [R]

Danial, N. K. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116: 205–219. [R]

Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3637–3640. [P]

Dorsam, R. T. and J. S. Gutkind. 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer* 7: 79–94. [R]

Downward, J. 2006. Prelude to an anniversary for the *RAS* oncogene. *Science* **314: 433–434. [R]**

Krontiris, T. G. and G. M. Cooper. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1181–1184. [P]

Leder, P., J. Battey, G. Lenoir, C. Moulding, W. Murphy, H. Potter, T. Stewart and R. Taub. 1983. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765–771. [R]

Martin, G. S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227: 1021–1023. [P]

Mitelman, F., B. Johansson and F. Mertens. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Rev. Cancer* 7: 233–245. [R]

Nussenzweig, A. and M. C. Nussenzweig. 2010. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell* 141: 27–38. [R]

Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka and D. Bar-Sagi. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Rev. Cancer* 11: 761–774. [R]

Shih, C., L. C. Padhy, M. Murray and R. A. Weinberg. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 300: 539–542. [P]

Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop and P. K. Vogt. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170–173. [P]

Stephen, A. G., D. Esposito, R. K. Bagni and F. McCormick. 2014. Dragging Ras back in the ring. *Cancer Cell* 25: 272–281. [R]

Tabin, C. J., S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy and E. H. Chang. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300: 143–149. [P]

Thorpe, L. M., H. Yuzugullu and J. J. Zhao. 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Rev. Cancer* 15: 7–24. [R]

Vanhasesebroeck, B., L. Stephens and P. Hawkins. 2012. PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 195203. [R]

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med.* 10: 789–799. [R]

Vogt, P. K. 1971. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology* 46: 939–946. [P]

Vogt, P. K. 2012.Retroviral oncogenes: a historical primer. *Nature Rev. Cancer* 12: 639–648. [R]

Genes supresores de tumores

Adams, B. D., A. L. Kasinski and F. J. Slack. 2014. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr. Biol.* 24: R762–R776. [R]

Chan, E., D. E. Prado and J. B. Weidhaas. 2011. Cancer microRNAs: from subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends Mol. Med.* 17:235–243. [R]

Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643–646. [P]

Hammond, S. M. 2007. MicroRNAs as tumor suppressors. *Nature Genet.* 39: 582–583. [R]

Harris, H., O. J. Miller, G. Klein, P. Worst and T. Tachibana. 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223: 363–368. [P]

Kastan, M. B. and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316–323. [R]

Knudson, A. G. 1976. Mutation and cancer: A statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820–823. [P]

Lee, W.-H., R. Bookstein, F. Hong, L.-J. Young, J.-Y. Shew and E. Y.-H. P. Lee. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394–1399. [P]

Levine, A. J. and M. Oren. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Rev. Cancer* 9: 749–758. [R]

Manning, A. L. and N. J. Dyson. 2011. pRB, a tumor suppressor with a stabilizing presence. *Trends Cell Biol.* 21: 433–441. [R]

Muller, P. A. J. and K. H. Vousden. 2014. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25: 304–317. [R]

Narod, S. A. and W. D. Foulkes. 2004. *BRCA1* and *BRCA2*: 1994 and beyond. *Nature Rev. Cancer* 4: 665–676. [R]

Negrini, S., V. S. Gorgoulis and T. D. Halazonetis. 2010. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 220–228. [R]

Pardali, K. and A. Moustakas. 2007. Actions of TGF- as a tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1775: 21–62. [R]

Sherr, C. J. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* 116: 235–246. [R]

Song, M. S., L. Salmena and P. P. Pandolfi. 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 283–296. [R]

Stratton, M. R. 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331: 1553–1558. [R]

Ventura, A. and T. Jacks. 2009. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 136: 586–591. [R]

Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz Jr. and K. W. Kinzler. 2013. Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546–1558. [R]

Vousden, K. H. and C. Prives. 2009. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 137: 413–431. [R]

Wood, L. D. and 41 others. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318: 1108–1113. [P]

Enfoques moleculares para el tratamiento del cáncer

Amakye, D., Z. Jagani and M. Dorsch. 2013. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Med.* 19: 1410–1422 [R]

Arteaga, C. L. and J. A. Engelman. 2014. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 25: 282–303. [R]

Chong, C. R. and P. A. Jänne. 2013. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nature Med.* 19: 1389–1400. [R]

de The, H. and Z. Chen. 2010. Acute promyelocytic leukemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nature Rev. Cancer* 10: 775–783. [R]

Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541–8546. [R]

Engelman, J. A. 2009. Targeting PI3K signaling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Rev. Cancer* 9: 550–562. [R].

Flaherty, K. T., F. S. Hodi and D. E. Fisher. 2012. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nature Rev. Cancer* 12: 349–361. [R]

Fruman, D. A. and C. Rommel. 2014. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature Rev. Drug Disc.* 13: 140–156. [R]

Gschwind, A., O. M. Fischer and A. Ullrich. 2004. The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 4: 361–370. [R]

Haber, D. A., N. S. Gray and J. Baselga. 2011. The evolving war on cancer. *Cell* 145: 19–24. [R]

Herbst, R. S., M. Fukuoka and J. Baselga. 2004. Gefitinib—A novel targeted approach to treating cancer. *Nature Rev. Cancer* 4: 956–965. [R]

Holderfield, M., M. M. Deuker, F. McCormick and M. McMahon. 2014. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Rev. Cancer* 14: 455-467. [R]

Imai, K. and A. Takaoka. 2006. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Rev. Cancer* 6: 714–727. [R]

Janne, P. A., N. Gray and J. Settleman. 2009. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nature Rev. Drug Disc.* 8: 709–723. [R]

Kerbel, R. S. 2006. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* 312: 1171–1175. [R]

Lo, J. A. and D. E. Fisher. 2014. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 346: 945–949. [R]

Luo, J., N. L. Solimini and S. J. Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136: 823–837. [R]

O'Hare, T., A. S. Corbin and B. J. Druker. 2006. Targeted CML therapy: Controlling drug resistance, seeking cure. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 16: 92–99. [R]

Rahman, N. 2014. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature* 505: 302–308. [R]

Samatar, A. A. and P. I. Poulikakos. 2014. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature Rev. Drug Disc.* 13: 928–942. [R]

Sawyers, C. L. 2004. Targeted cancer therapy. *Nature* 432: 294–297. [R]

Sellers, W. R. 2011. A blueprint for advancing genetics-based cancer therapy. *Cell* 147: 26–31. [R]

Sharma, S. V. and J. Settleman. 2007. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* 21: 3214–3231. [R]

Varmus, H. 2006. The new era in cancer research. *Science* 312: 1162–1165. [R]

Weinstein, I. B. 2002. Addiction to oncogenes—The Achilles heal of cancer. *Science* 297: 63–64. [R]

Weisberg, E., P. W. Manley, S. W. Cowan-Jacob, A. Hochhaus and J. D. Griffin. 2007. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Nature Rev. Cancer* 7: 345–356. [R]

Respuestas a las preguntas

CAPÍTULO 1

1. Los experimentos de Stanley Miller demostraron que pueden formarse espontáneamente moléculas orgánicas, incluidos varios aminoácidos, a partir de una mezcla de gases reductores.
2. El ARN es único en su capacidad de servir tanto como molde y de catalizar las reacciones químicas necesarias para su propia replicación.
3. Las mitocondrias y cloroplastos contienen sus propios ADN y mitocondrias, son similares en tamaño a las bacterias y se dividen como las bacterias. Las proteínas ribosómicas y los ARN de estos orgánulos también están más estrechamente relacionados con los de las bacterias que los codificados por los genomas eucariotas.
4. Porque el O_2 se hizo abundante en la atmósfera de la Tierra como resultado de la fotosíntesis.
5. El volumen de una esfera viene definido por la fórmula $4/3\pi r^3$, donde r = radio. Puesto que el volumen de las células es proporcional al cubo de su radio, el volumen relativo de un macrófago comparado con *S. aureus* es la relación entre los cubos de sus radios: $25^3/0{,}5^3 = 125.000$.
6. Las levaduras son el sistema más simple para estudiar la replicación del ADN en eucariotas.
7. Ratón.
8. El índice de refracción del aire es 1,0; el índice de refracción del aceite es aproximadamente 1,4. Puesto que la resolución = $0{,}61/\eta$ sen α (η es el índice de refracción), observar una muestra a través del aire en vez de a través del aceite supone que el límite de resolución varíe de 0,2 µm a 0,3 µm.
9. Resolución = $0{,}61\lambda/NA$. Tomando λ = 0,5 µm para la luz visible, el objetivo con un NA = 1,3 µm resolverá objetos con una separación de 0,23 µm, mientras que el objetivo de NA = 1,1 resolverá objetos distanciados unos 0,27 µm. El aumento de las imágenes puede obtenerse mediante otros métodos (como la proyección en una pantalla o empleando una lente ocular con más aumentos). Así, la mejor opción sería un objetivo de ×60 aumentos y una apertura numérica de 1,3.
10. Las proteínas marcadas con GFP pueden expresarse en células vivas, de modo que pueden verse sin necesidad de fijar y matar las células para marcarlas con un anticuerpo fluorescente. El movimiento de las proteínas marcadas con GFP puede seguirse por lo tanto en células vivas.
11. La velocidad de centrifugación separa los orgánulos según su tamaño y su forma, mientras que la centrifugación de equilibrio los separa de acuerdo con su densidad (independientemente del tamaño y la forma).
12. El suero contiene factores de crecimiento que son necesarios para la división estimulada de la mayor parte de las células animales en cultivo.
13. Los cultivos celulares primarios son cultivos de células obtenidas directamente de un organismo o un tejido. Las líneas celulares inmortales poseen la capacidad de proliferar indefinidamente en cultivo.
14. Estas células retienen la capacidad de diferenciarse en todos los diferentes tipos celulares de los organismos adultos, de modo que ofrecen el potencial de usarse en terapias de trasplante para el tratamiento de una diversidad de países.

CAPÍTULO 2

1. El agua es una molécula polar cuyos hidrógenos y oxígeno pueden formar puentes de hidrógeno entre ellos (para hacer que el agua sea líquida a la mayoría de las temperaturas de la Tierra) y sirve como un buen disolvente para las moléculas orgánicas polares y para los iones inorgánicos. El agua también repele a las moléculas, o a sus partes apolares, y las obliga a asociarse entre ellas para formar estructuras importantes como la membrana celular y de los orgánulos.
2. El glucógeno es un polímero de la glucosa conectado principalmente por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ glucosídicos, y posee ocasionalmente enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ que producen ramificaciones. La celulosa es un polímero rectilíneo, sin ramificaciones, de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ entre residuos de glucosa.
3. Las grasas se acumulan en gotas lipídicas en las células (especialmente adipocitos) y son una forma eficaz de almacenaje de energía. Los fosfolípidos funcionan como el principal componente de las membranas celulares.
4. Los nucleótidos funcionan como transportadores de energía química (p. ej., ATP) y como moléculas de señalización intracelular (p. ej., AMP cíclico).
5. No. La información de los ácidos nucleicos se transmite mediante la secuencia de sus bases. Si las bases fueran eliminadas, quedaría una cadena de azúcar fosfato lineal con poco contenido informativo.
6. Christian Anfinsen y sus colaboradores demostraron que la ribonucleasa desnaturalizada puede espontáneamente volver a plegarse en una enzima activa en ausencia de otros constituyentes celulares. Esto demostraba que la in-

formación necesaria para el plegamiento estaba contenida en la secuencia primaria de la ribonucleasa.

7. La cadena lateral de la cisteína contiene un grupo sulfhidrilo que puede formar enlaces covalentes disulfuro con otro residuo de cisteína, estabilizando la estructura de la superficie celular y las proteínas secretadas.
8. El colesterol puede incorporarse en las membranas, donde regula la fluidez de la membrana. Adicionalmente, el colesterol es empleado en la síntesis de hormonas esteroideas.
9. La estructura en α-hélice permite a los grupos CO y NH de los enlaces peptídicos formar enlaces de hidrógeno entre ellos, neutralizando así su carácter polar: los barriles-β también son capaces de atravesar las bicapas lipídicas.
10. d. La alanina es el único aminoácido de la lista con una cadena lateral hidrofóbica capaz de interaccionar con los ácidos grasos de las membranas lipídicas.
11. El aspartato es un aminoácido de carácter ácido que interacciona con aminoácidos básicos en los sustratos de tripsina. La sustitución de aspartato por lisina (un aminoácido básico) interferiría en la unión al sustrato y la catálisis.
12. La cadena lateral de histidina puede no tener carga o poseer carga positiva a pH fisiológico, con lo que permite su uso para el intercambio de iones hidrógeno.
13. Las proteínas de canal forman poros abiertos a través de la membrana, mientras que las proteínas transportadoras se unen selectivamente y transportan moléculas pequeñas.

CAPÍTULO 3

1. Una reacción energéticamente desfavorable puede acoplarse a una reacción energéticamente favorable con un incremento de energía libre negativa elevado (a menudo la hidrólisis de ATP), de modo que la reacción combinada es energéticamente favorable.
2. La reacción catalizada por la fosfofructoquinasa es fructosa-6-fosfato + ATP → fructosa-1,6-bifosfato + ADP. El incremento de energía libre estándar puede calcularse como la suma de las variaciones de energía libre estándar de la formación de fructosa-1,6-bifosfato a partir de fructosa-6-fosfato y fosfato ($\Delta G^{o\prime}$= +4 kcal/mol), y la variación estándar de la energía libre de la hidrólisis del ATP (–7,3 kcal/mol), dando una variación de energía libre de –3,3 kcal/mol para la reacción acoplada.
3. Al sustituir los valores dados en la ecuación:

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}$$

se obtiene el siguiente resultado: ΔG = –1,93 kcal/mol. Por lo tanto, la reacción procederá de izquierda a derecha, lo que significa que, en la célula, A se convertirá en B más C.

4. La fosfofructoquinasa es inhibida mediante concentraciones elevadas de ATP. Así, la glucólisis será inhibida en respuesta a un incremento de la concentración celular de ATP.
5. Bajo condiciones anaeróbicas, la glucosa es metabolizada sólo a través de la glucólisis, con una producción neta de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. Bajo condiciones aeróbicas, la glucosa se oxida completamente para producir 36 – 38 moléculas de ATP.
6. Bajo condiciones anaeróbicas el NADH producido durante la glucólisis es empleado para reducir el piruvato en etanol o lactato, generando así NAD^+.
7. Puesto que los lípidos están más reducidos que los ácidos grasos, su oxidación genera mucha más energía por molécula.
8. El gradiente de protones de 1 unidad de pH corresponde a diez veces $[H^+]_o$. Al sustituir los valores anteriores en la ecuación

$$\Delta G = RT \ln [H^+]_i/[H^+]_o$$

obtenemos una respuesta de aproximadamente –1,4 kcal/mol.

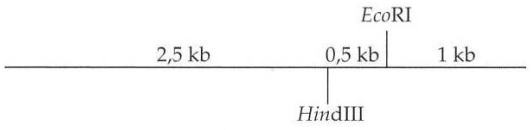
9. La coenzima Q acepta un par de electrones del complejo I o el complejo II y los transfiere al complejo III. También une dos protones de la matriz mitocondrial, los transporta a través de la membrana interna y los libera en el espacio intermembrana, con lo que contribuye a la generación de un gradiente de protones. El citocromo *c* es una proteína pequeña en el espacio intermembrana que captura un par de electrones del complejo III y lo transfiere al complejo IV.
10. Se necesitan dos electrones de alta energía para dividir cada molécula de H_2O, con lo que son necesarios 24 electrones de alta energía para la síntesis de cada molécula de glucosa. El paso de estos electrones a través de los dos fotosistemas genera 12 moléculas de NADPH y entre 12 y 18 moléculas de ATP, dependiendo del bombeo de protones en el complejo citocromo *bf*. Dado que se necesitan 18 moléculas de ATP para el ciclo de Calvin, la síntesis de glucosa puede requerir ATP adicional producido por el flujo electrónico cíclico.
11. En las reacciones lumínicas, la energía derivada de la absorción de luz por las clorofilas se emplea para dividir el agua en $2H^+ + 1/2\ O_2 + 2e^-$. Los electrones entran en una cadena de transporte de electrones que resulta en la síntesis de ATP y NADPH. En las reacciones oscuras, el ATP y el NADPH dirigen la síntesis de glucosa a partir de CO_2 y H_2O.
12. Algunas reacciones de la glucólisis implican un gran descenso en energía libre y no son fácilmente reversibles. La gluconeogénesis evita estas reacciones mediante otras reacciones dirigidas por el gasto de ATP y NADPH.

CAPÍTULO 4

1. Criarías moscas con mutaciones en dos genes diferentes. Si las mutaciones de los dos genes se heredan juntas con frecuencia, los genes estarían asociados y residirían en los mismos cromosomas.
2. La mitad del ADN será de densidad intermedia y la mitad será ligero.
3. La adición o deleción de uno o dos nucleótidos alteraría el marco de lectura del gen, resultando en una secuencia de aminoácidos completamente diferente a la proteína codificada.
4. Para clonar este fragmento de ADN humano, un cromosoma artificial de levadura necesitaría telómeros y un centrómero para replicarse como una molécula semejante a un cromosoma lineal, además de un origen de replicación y una diana de corte para *Eco*RI.
5. UGC también codifica la cisteína, de modo que esta mutación no tendría ningún efecto sobre la función enzimática. UGA, sin embargo, es un codón de terminación, así

que esta mutación generaría una proteína truncada que sería inactiva.

6. El mapa de restricción es:



7. El espermatozoide haploide contiene una única copia inicial de la secuencia de ADN. Cada ciclo de PCR amplifica por dos el material inicial, por lo que diez ciclos darían lugar a 2^{10}, aproximadamente mil copias. Al amplificarlo por 30 ciclos se generarían 2^{30}, o más de mil millones de copias.
8. De la Tabla 4.3, los cósmidos portan insertos de 30-45 kb. De la Tabla 4.2, la secuencia de reconocimiento de *Bam*HI tiene una longitud de 6 pares de bases, que ocurre con una frecuencia aleatoria de una vez cada 4.000 pares de bases de ADN ($4^6 = 4096$). Dividiendo 30.000-45.000 entre 4.000, esperamos unos 10 fragmentos de *Bam*HI en un inserto de un cósmido.
9. El genoma humano es de aproximadamente 3×10^6 kb, y el tamaño de un inserto para un vector BAC es de 120-300 kb (Tabla 4.3). Dividiendo el tamaño del genoma entre el tamaño del inserto indica que un mínimo de 10.000 a 25.000 clones de BAC serían necesarios para cubrir el genoma.
10. El virus de la gripe se replica mediante la síntesis de ARN dirigida por ARN, de modo que la actinomicina D (que inhibe la síntesis de ARN dirigida por ADN) no afecta a la replicación del virus de la gripe.
11. La característica esencial del vector de clonación sería un marcador elegible, como la resistencia a un principio activo, que te permite seleccionar las células establemente transfectadas.
12. Las proteínas son disueltas en una solución que contiene el detergente de carga negativa SDS. Cada proteína se une a muchas moléculas de SDS, que confiere una carga neta negativa a la proteína. A continuación, las proteínas pueden ser separadas mediante electroforesis en gel de acuerdo con su tamaño.
13. El sistema CRISPR/Cas se dirige a secuencias de ADN específicas por apareamiento homólogo con una molécula de ARN. Dado que los ARN homólogos con cualquier secuencia diana deseada pueden sintetizarse fácilmente, se trata de un método muy eficaz para introducir mutaciones génicas direccionadas en células de mamíferos.

CAPÍTULO 5

1. Las secuencias codificantes de proteínas pueden identificarse como largas extensiones de secuencias de nucleótidos que pueden codificar polipéptidos debido a que no contienen codones de terminación de cadena.
2. La fracción de secuencia codificante de proteínas es mucho menor en el genoma humano: aproximadamente el 1%, en comparación con el 70% en *S. cerevisiae*.
3. El número de genes codificantes de proteínas en las manzanas es más del doble que el número de estos genes en el ser humano.
4. Una proteína es digerida para producir pequeños péptidos, cuya relación masa-carga se determina por espectrometría de masas. A continuación puede compararse el espectro de masas determinado experimentalmente con una base de datos de todas las proteínas conocidas para identificar la proteína de interés.
5. Las mitocondrias de las células cancerígenas y normales pueden aislarse por fraccionamiento subcelular. Sus composiciones de proteínas pueden determinarse después por espectrometría de masas *shotgun*.
6. Una proteína puede obtenerse por inmunoprecipitación a partir de un extracto celular en condiciones suaves, de manera que la proteína objeto inmunoprecipitada siga asociada con las proteínas con las que interacciona normalmente en el interior de la célula. Entonces pueden analizarse los complejos de proteínas inmunoprecipitadas, por ejemplo por espectrometría de masas, para identificar las proteínas de interacción que se sometieron a inmunoprecipitación junto con la proteína objeto.
7. Las células cancerígenas y las células normales pueden cribarse para identificar ARNsi que interfieren con el crecimiento de células cancerosas, pero no con las normales. Estos ARNsi identificarían genes requeridos específicamente para el crecimiento de las células del cáncer de mama.
8. La secuenciación de la siguiente generación puede utilizarse para secuenciar todos los ARN expresados en una célula, con lo que se identifican todas las secuencias transcritas.
9. A diferencia de las secuencias codificantes de proteínas, las secuencias reguladoras son cortas y mal definidas y aparecen frecuentemente por azar en los genomas grandes, lo que dificulta la identificación de secuencias reguladoras funcionales. Los enfoques utilizados para identificar secuencias reguladoras funcionales incluyen la búsqueda de grupos de elementos reguladores, de secuencias que se conserven en la evolución y de secuencias que estén presentes en genes regulados de forma coordinada.
10. Mediante el diseño de sistemas biológicos sintéticos (no naturales), los expertos en biología de síntesis confían en conseguir una mejor comprensión de los principios que rigen el comportamiento de las células existentes (naturales).

CAPÍTULO 6

1. Los organismos con genomas mayores que su complejidad poseen mayores cantidades de ADN no codificante.
2. Phillip Sharp y sus colaboradores construyeron híbridos entre hexones de ARN de adenovirus y ADN vírico de hebra sencilla. Tras su observación bajo un microscopio electrónico, observaron que el ARNm del hexón hibrida con regiones separadas del ADN vírico y el ADN intermedio no hibridado formaba lazos. Los lazos de ADN de hebra sencilla correspondían a los intrones que eran eliminados mediante corte y empalme del tránscrito primario.
3. Mediante procesamiento alternativo más de una proteína puede ser sintetizada a partir del mismo gen, incrementando así la diversidad de proteínas expresadas a partir de un número limitado de genes.
4. Debido a su diferente composición de bases, las repeticiones de secuencias sencillas (p. ej., ACAAACT) difieren en densidad de la relación AT/GC de la mayor parte del ADN nuclear. Las secuencias que contienen copias en tándem de estas repeticiones se separarán en una centrifugación en CsCl para formar bandas satélite que son diferentes de la banda principal de ADN genómico.

5. Los ARN no codificantes pueden regular la expresión génica en el nivel de transcripción (ARN largos no codificantes) o influyendo en la traducción y la estabilidad de ARNm (ARNmi).
6. Un pseudogene procesado no conendría intrones.
7. Un centrómero de *S. cerevisiae* es pequeño (125 pares de bases) y presumiblemente se une a un número limitado de proteínas cinetocóricas para formar un solo dominio de unión a microtúbulos. Los centrómeros de los cromosomas animales son mucho mayores, con secuencias repetidas que forman cinetócoros más extensos y proporcionan puntos de unión a múltiples microtúbulos.
8. Cortar el plásmido con un endonucleasa de restricción crea un cromosoma lineal con dos extremos libres, pero no telómeros. Los genes plasmídicos se pierden rápidamente debido a la inestabilidad de los extremos cromosómicos. Para comprobar esto, podrías unir las secuencias teloméricas a los extremos del plásmido linearizado y ver si esto permite que el plásmido se herede de forma estable.
9. Una molécula de histona H1 se une al ADN genómico aproximadamente cada 200 pb, de forma que el número de histonas H1 unidas al genoma de levaduras puede determinarse mediante la división del tamaño del genoma de levadura (12 Mb) entre 200 pb para generar un valor de 60.000.
10. De la Tabla 6.1, podemos calcular la longitud media del intrón humano dividiendo la longitud total de la secuencia intrónica entre el número de intrones en un gen humano medio: aproximadamente 5.800 pb.
11. De la Tabla 6.1, la secuencia exónica de un gen humano medio suma 4.300 pb. Esto sería la longitud media esperada de los insertos completos de ADNc en tu genoteca.
12. Las plantas contienen muchos genes duplicados debido a duplicaciones de todo su genoma.

CAPÍTULO 7

1. A una temperatura elevada el mutante tendría defectos al reemplazar los cebadores de ARN con ADN en los fragmentos de Okazaki y en rellenar los espacios en el ADN que siguen a la reparación por escisión.
2. La topoisomerasa I corta una hebra del ADN en doble hélice y le permite girar en torno al otro enlace fosfodiéster para aliviar la tensión del giro. La topoisomerasa II corta a ambas hebras del ADN en doble hélice y puede pasar otra molécula de ADN a través del corte para separar las moléculas asociadas (p. ej., durante la mitosis).
3. De la Tabla 5.1, el tamaño del genoma de levadura es de 12 Mb (12 millones de pares de bases), mientras que los fragmentos de Okazaki poseen aproximadamente 1–3 kb (1.000–3.000 pares de bases) de longitud. Podemos calcular el número de fragmentos de Okazaki sintetizados durante la replicación mediante la división del tamaño del genoma entre la longitud de los fragmentos de Okazaki, dando un resultado de 4.000–12.000.
4. Las ADN polimerasas son incapaces de iniciar la síntesis de ADN *de novo*: sólo pueden añadir nucleótidos a una hebra cebadora preexistente. La primasa inicia *de novo* y sintetiza cebadores cortos de ARN, que pueden ser extendidos a continuación por una ADN polimerasa.
5. La actividad exonucleasa 3′ a 5′ es necesaria para la escisión de bases mal apareadas en ADN recién sintetizado. Un mutante de *E. coli* con una ADN polimerasa III que carece de esta actividad poseería una elevada frecuencia de mutaciones cada vez que se replique el ADN.
6. Insertarías la secuencia de ADN en plásmidos que carecen de un origen de replicación y determinarías si el plásmido recombinante es capaz de transformar levaduras mutantes que requieren un gen plasmídico para su crecimiento y división. Sólo los plásmidos con un origen funcional generarán una elevada frecuencia de colonias de levaduras transformadas.
7. Las ADN polimerasas son incapaces de replicar los extremos de las moléculas de ADN lineal; las células de levadura tienen telomerasa evolucionada para mantener los extremos de sus cromosomas lineales. Dado que el genoma de *E. coli* es una molécula de ADN circular y no tiene extremos, no se necesitan mecanismos especiales para replicar los extremos de ADN lineal.
8. Las roturas de doble cadena pueden repararse por medio de una reparación recombinatoria, en la cual la parte ausente de un cromosoma puede recuperarse a partir de un cromosoma homólogo. Las roturas de cadena única se reparan mediante escisión, dado que existe una cadena complementaria no dañada disponible para su empleo como plantilla con el fin de dirigir la síntesis de la parte escindida de la cadena dañada.
9. La elevada frecuencia del cáncer de piel se debe a las lesiones en el ADN causadas por la radiación solar UV, las cuales se pueden reparar por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos. El que otros cánceres no tengan esta incidencia tan elevada sugiere que este tipo de lesión no es frecuente en los órganos internos, y que la mayoría de los cánceres se deben a otros tipos de mutaciones (p. ej., la incorporación de bases desapareadas durante la replicación del ADN).
10. Los procesos celulares que podrían estar afectados por estos principios activos incluyen el mantenimiento de los telómeros mediante la telomerasa y la transposición de retrotransposones.
11. En lugar de emplear la metilación de hebras parentales, el sistema de reparación de bases mal apareadas en humanos emplea las roturas de una sola hebra para identificar el ADN recién replicado. Así, un homólogo de *Mut H* no es necesario para las células humanas.
12. El ratón sería inmunodeficiente, careciendo tanto de linfocitos B como T, como resultado de ser incapaces de reorganizar sus genes de inmunoglobulinas y del receptor de células T.

CAPÍTULO 8

1. Los factores sigma se unen a secuencias corriente arriba del punto de iniciación de la transcripción, trayendo a la ARN polimerasa específicamente a la región del promotor para iniciar la transcripción.
2. El tipo más común de terminación implica la transcripción de una repetición invertida rica en GC que forma una estructura de tallo-lazo mediante complementariedad de bases. La formación de esta estructura desorganiza la asociación del ARNm con el ADN y termina la transcripción.
3. La unión del represor con el operador influye en la unión de la ARN polimerasa al promotor, como consecuencia de lo cual se inhibe la transcripción.
4. El promotor que contiene la caja TATA puede transcribirse *in vitro* en presencia de TBP o TFIID. Sin embargo, el promotor Inr requiere TFIID, puesto que la secuencia Inr es reconocida por los TAF en lugar de por TBP.

5. La actividad de los *enhancers* no depende ni de la distancia ni de su orientación con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Los promotores se definen como cercanos al sitio de iniciación de la transcripción.
6. El elemento de la secuencia sería un sitio de unión potencial para un represor específico de tejido.
7. Dividen cromosomas en dominios individuales de estructura cromatínica que puede ser eucromatina o heterocromatina, pero no puede extenderse más allá del aislante. Además, previenen que un *enhancer* en un dominio actúe sobre un promotor del dominio siguiente.
8. Muchos ARNlnc forman complejos con proteínas que modifican la cromatina y reclutan estos complejos de modificación de cromatina en sus genes diana. Además, algunos ARNlnc interaccionan con factores de transcripción, mediadores, o componentes de la maquinaria de transcripción basal, y otros ARNlnc interaccionan con proteínas que regulan el procesamiento o traducción de ARNm.
9. La unión específica de alta afinidad de Sp1 a la caja GC de la secuencia de ADN se explotó para su purificación bioquímica mediante cromatografía de afinidad de ADN. Para demostrar que la proteína purificada es Sp1, podrías llevar a cabo ensayos de transcripción *in vitro*.
10. El antisuero anti-Sm se uniría a las RNPsn y prevendría su unión a los sitios de procesamiento, inhibiendo así el corte y empalme.
11. Los promotores y estimuladores flanqueantes de nucleosomas tienen diferentes modificaciones de histonas que pueden distinguirse por inmunoprecipitación de cromatina. Los promotores se marcan mediante la forma trimetilada de H3 lisina-4, mientras que los estimuladores se caracterizan por la forma monometilada de esta lisina.
12. Los factores de procesamiento dirigen a los RNPsn a las dianas correctas de corte y empalme mediante su unión a secuencias específicas del pre-ARNm.
13. Apo-B100 es sintetizado en el hígado mediante la traducción de un ARNm no editado. La Apo-B48 más corta es sintetizada en el intestino mediante la traducción de un ARNm editado en el que la reacción de edición ha generado un codón de terminación.
14. La degradación del ARNm sin sentido es un proceso de control de calidad por el que los ARNm que carecen de marcos de lectura completos son degradados. Este proceso elimina los ARNm defectuosos que darían lugar a proteínas anómalas truncadas.

CAPÍTULO 9

1. Muchos ARNt son capaces de formar enlaces de hidrógeno con más de un codón porque la tercera base de su anticodón puede «temblar» o aparearse de formas no estándar con numerosos nucleótidos distintos de sus pares complementarios habituales.
2. Se necesita una secuencia Shine-Delgarno para unirse a los ribosomas bacterianos.
3. Los ribosomas deplecionados de la mayoría de sus proteínas todavía pueden sintetizar polipéptidos, mientras que el tratamiento con ARNasa acaba por completo con la actividad traduccional. Adicionalmente, el análisis estructural de alta resolución de la subunidad ribosómica 50S mostró que el sitio en el que tiene lugar la reacción de peptidil transferasa está compuesto por ARNr, no proteínas ribosómicas.
4. La poliadenilación es un mecanismo importante de regulación de la traducción en el desarrollo temprano. Su inhibición bloquearía la traducción de muchos ARNm de oocitos tras la fecundación.
5. Las chaperonas son proteínas que ayudan al correcto plegamiento de otras proteínas. Las temperaturas elevadas pueden desnaturalizar las proteínas. Las proteínas de choque térmico son chaperonas que facilitan el replegamiento de estas proteínas desnaturalizadas, restaurando así la correcta función proteica.
6. El tratamiento con fosfolipasa liberaría de la superficie celular una proteína unida a GPI, pero no una proteína transmembrana.
7. La degradación de la ciclina B, que permite a las células salir de la mitosis, requiere una secuencia específica de 9 aminoácidos denominada caja de destrucción. Las mutaciones de esta secuencia previenen la ubiquitinación y la degradación de la ciclina B y bloquean la salida de la mitosis.
8. No. Además de dirigir proteínas hacia su degradación, la ubiquitinación de una proteína puede poseer otras funciones, incluyendo dirigir proteínas para una modificación de histonas que regula la transcripción
9. Los ARNmi pueden dirigir ARNm específicos mediante el complejo RISC, desencadenando la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción.
10. Las secuencias de los UTR 3′ pueden regular la estabilidad, localización y traducción funcionando como sitios de unión para factores de regulación de los ARNmi.
11. Las señales secuencia que dirigen las proteínas hacia compartimentos celulares específicos a menudo son retiradas mediante la acción de las peptidasas señal. Adicionalmente, muchas proteínas son sintetizadas como proteínas precursoras mayores y son procesadas proteolíticamente para generar proteínas maduras.
12. Un «centro de decodificación» en la subunidad menor del ribosoma reconoce los pares de bases codón-anticodón correctos y discrimina frente a apareamientos erróneos. La inserción de un aminoacil ARNt correcto en el sitio A induce un cambio conformacional que causa la hidrólisis del GTP unido a eEF-1α y la liberación del factor de elongación unido a GDP.
13. El PDI cataliza la formación de puentes disulfuro. La inhibición del PDI por el ARNsi interferirá en el plegamiento correcto de la ARNasa, por lo que detectarás una actividad ARNasa mucho menor en el cultivo de células que expresan ARNsi.

CAPÍTULO 10

1. Los ARNm procarióticos son traducidos a medida que se transcriben. La separación del sitio de transcripción del sitio de traducción en eucariotas permite la regulación de los ARNm mediante procesos postraduccionales, como el corte y empalme alternativo, la poliadenilación, y el transporte regulado del citoplasma. Adicionalmente, la transcripción puede ser regulada mediante la modulación de la localización nuclear de los factores de transcripción.
2. Las lamininas de la red filamentosa que soporta y estabiliza la envuelta nuclear. Las lamininas también proporcionan sitios de unión para que la cromatina se una al interior de la envuelta nuclear. Además, muchas de las proteínas que participan en la transcripción, la replicación del ADN y la modificación de la cromatina, interaccionan con las lamininas.

3. La proteína de 15 kd, pero no la de 100 kd, será capaz de entrar en el núcleo, puesto que las proteínas inferiores a aproximadamente 40 kd pueden difundir libremente a través del complejo del poro nuclear.
4. La distribución de Ran/GTP a través de la envuelta nuclear determina la dirección del transporte nuclear.
5. Un ejemplo de esta regulación mediante introducción en el núcleo lo constituye NF-κB. En células no estimuladas, IκB se une a NF-κB, y el complejo no puede internarse en el núcleo. Tras la estimulación, el IκB es fosforilado y degradado mediante proteólisis mediada por ubiquitina. Esto expone la señal de localización nuclear de NF-κB, permitiéndole entrar y activar la transcripción de los genes diana.
6. El factor de transcripción ya no podría ser fosforilado en estas dianas, de modo que sería importado constitutivamente al núcleo para activar la expresión de los genes diana.
7. La inactivación de la señal de exportación nuclear resultaría en la retención de la proteína en el núcleo.
8. Podrías marcar el ADN recién sintetizado con bomodesoxiuridina, que se incorpora en el ADN en lugar de la timina. El ADN marcado con bromodesoxiuridina puede localizarse mediante anticuerpos contra el bromodesoxiuridina y el uso de microscopia de fluorescencia.
9. Smith y sus colaboradores fusionan la secuencia aminoacídica 126 a 132 del antígeno T a las proteínas normalmente citoplásmicas, β-galactosidasa y piruvato quinasa. Estas proteínas de fusión se acumulan en el núcleo.
10. Las motas nucleares contienen poblaciones concentradas de RNPsn y se cree que son sitios de almacenamiento de componentes del corte y empalme.
11. Los ARN pequeños y nucleolares (ARNsno) se localizan en el nucléolo donde participan en la escisión y modificación de los ARNr.
12. La exportina-t es necesaria para el exporte de ARNt desde el núcleo, de modo que inhibiendo la función de la exportina-t prevendría la exportación del ARNt y desencadenaría la inhibición de la traducción.

CAPÍTULO 11

1. George Palade y sus colaboradores trataron a las células acinares pancreáticas con un pulso de aminoácidos radioactivos, que se incorporan en las proteínas. La autorradiografía mostró que las proteínas marcadas se detectaron en primer lugar en el RE rugoso. Tras una corta «persecución» de aminoácidos no radiactivos, las proteínas marcadas se movieron al aparato de Golgi, y tras períodos más largos, las proteínas marcadas se encontraron en las vesículas secretoras y después en el exterior de las células.
2. Cuando un ARNm que codifica para una proteína secretada es traducido *in vitro* sobre ribosomas libres, resulta una proteína mayor que la obtenida cuando el mismo ARNm es traducido en presencia de microsomas del RE rugoso. En el último caso, la secuencia señal es escindida por una peptidasa señal en las vesículas del RE rugoso.
3. La translocación cotraduccional implica la unión a la partícula de reconocimiento de la señal y la translocación a través del translocón dirigido por el proceso de síntesis en los ribosomas. La translocación postraduccional dirige a un polipéptido al RE tras la finalización de la síntesis y no requiere una SRP. Un complejo Sec 62/63 reconoce a un polipéptido que debe ser incorporado, y lo inserta en un translocón. El polipéptido es arrastrado al lumen del RE por una chaperona denominada «BiP».
4. Las proteínas unidas al aparato de Golgi son incapaces de penetrar en el RE en un mutante Sec61 y por lo tanto permanecen en el citosol.
5. Los grupos hidrocarbonados se añaden en el lumen del ER y del aparato de Golgi, que son topológicamente equivalentes al exterior de la célula.
6. La mutación de la secuencia KDEL inhibiría el retorno de la proteína residente en el RE desde el Golgi al RE, de modo que sería secretado al exterior celular. La inactivación de la proteína receptora de KDEL resultaría en la secreción de todas las proteínas del RE que contienen la secuencia KDEL.
7. Inicialmente, una secuencia señal dirige al polipéptido lisosómico naciente o a la proteína prelisosómica al RE, entonces se le añade un oligosacárido mediante un enlace *N*. Después de trasladarse al Golgi, se mantienen tres residuos de manosa que normalmente se eliminan, y se convierten en manosa-6-fosfato en un proceso en dos pasos (que tiene lugar en el *cis* Golgi). Estos residuos de manosa-6-fosfato son reconocidos y unidos por un receptor en la red del *trans* Golgi, que dirige su transporte a los lisosomas. La proteína normalmente citosólica carece de una secuencia señal y por lo tanto no entra en el RE. Por lo tanto, la adición de una señal de localización lisosómica no tendría ningún efecto. Por el contrario, dicha adición dirigiría una proteína normalmente secretada hacia los lisosomas desde el aparato de Golgi.
8. En ausencia de la síntesis de manosa-6-fosfato en el aparato de Golgi, las proteínas lisosomales normales serían secretadas.
9. Los glicolípidos y la esfingomielina son producidos por la adición de azúcares o fosforilcolina a la ceramida en las superficies citosólica y lumínica, respectivamente, del aparato de Golgi. La glucosilceramida es a continuación traspasada a la superficie lumínica. Después del transporte vesicular y fusión con la membrana plasmática, estos lípidos se localizan en la mitad externa de la membrana plasmática.
10. El diagnóstico de la enfermedad de Gaucher. Puesto que la patología implica una mutación en la hidrolasa glucocerebrosidasa lisosómica, podrías sugerir la terapia de sustitución enzimática.
11. Las enzimas destinadas para los lisosomas son hidrolasas ácidas y no son activas a los pH neutrales del citoplasma, el RE, o el aparato de Golgi. Las hidrolasas ácidas son activadas por el pH ácido de los lisosomas, que se mantiene mediante bombas de protones lisosómicas.
12. La fuerte interacción entre los dominios superenrolados de los SNARE vesiculares y diana sitúa a las dos membranas casi en contacto directo. Esto produce inestabilidad en la membrana y da lugar a que las membranas se fusionen.

CAPÍTULO 12

1. El área de superficie de la membrana mitocondrial interna es elevado debido a la formación de crestas. Además, el contenido proteico de la membrana es especialmente elevado (>70%), e incluye numerosas enzimas y transportadores de electrones.
2. Los ARNt mitocondriales son capaces de hacer una forma extrema de tiemblo en el que el anticodón U puede

aparearse con cualquiera de las cuatro bases en la tercera posición del ARNm, permitiendo que cuatro codones sean reconocidos por un solo ARNt.

3. Las proteínas Hsp70 en el citosol mantienen proteínas mitocondriales recién sintetizadas en un estado sin plegar para que puedan ser insertadas en el complejo Tom y ser importadas como una cadena sin plegar. Las chaperonas de la matriz mitocondrial Hsp70 se unen a la cadena polipeptídica a medida que emerge del complejo Tim y emplean la hidrólisis de ATP para arrastrar el polipéptido hacia la matriz.
4. La energía para el transporte de metabolitos es proporcionada por el gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial.
5. La membrana interna de las mitocondrias y la membrana del tilacoide de los cloroplastos son sitios de transporte de electrones y fosforilación oxidativa.
6. Al contrario que las mitocondrias, no existe potencial eléctrico a través de la membrana del cloroplasto. Así que la carga de los péptidos de tránsito no contribuye a la translocación de la proteína.
7. Se translocará a través de las membranas de cloroplastos pero permanecerá en el estroma del cloroplasto en lugar de ser translocado en la luz del tilacoide.
8. Los cromoplastos contienen carotenoides en lugar de clorofila y no incluyen membrana del tilacoide.
9. La mayor parte de las proteínas transmembrana del peroxisoma se sintetizan en el RE y son transportadas en vesículas que se fusionan para formar peroxisomas. Otras proteínas transmembrana son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol y dirigidas a la membrana del peroxisoma por una señal de direccionamiento de membrana.
10. Pex5 es el principal receptor citosólico para la importación de proteínas de matriz de peroxisoma, con lo cual la depleción de Pex5 con ARNsi evitaría la prevención de la mayor parte de las proteínas de matriz.

CAPÍTULO 13

1. Los monómeros de actina asimétricos se asocian de forma cabeza-cola para formar los filamentos de actina. Puesto que todos los monómeros se orientan en la misma dirección, el filamento tiene una clara polaridad. La polaridad de los filamentos de actina define la dirección del movimiento de la miosina. Si los filamentos de actina no fuesen polares, el movimiento unidireccional de la miosina que resulta del deslizamiento de los filamentos de actina y miosina no tendría lugar.
2. La citocalasina se une al extremo positivo de los filamentos de actina y bloquea su elongación, de modo que daría lugar a la despolimeración de los fragmentos *treadmilling*. La faloidina se une a los filamentos de actina e inhibe su despolimerización, de modo que causaría que los filamentos detuviesen el *treadmilling*, pero permanecerían presentes y se harían más largos.
3. La cofilina secciona los filamentos de actina y genera nuevos extremos de filamentos que pueden crecer o despolimerizarse. La profilina une actina/ADP y estimula el intercambio de ADP por ATP, formando monómeros de actina/ATP que pueden unirse a los filamentos crecientes. El complejo Arp2/3 inicia la formación de ramificaciones.
4. La banda I y la zona H se acortan durante la contracción. La banda A no se acorta porque está ocupada por filamentos de miosina gruesos.
5. La contracción de las células de músculo liso está regulada por la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina por parte de la quinasa de la cadena ligera de miosina, que a su vez está regulada por la asociación de la proteína de unión a calcio calmodulina. Un incremento en la concentración citosólica de calcio da lugar a la unión de calmodulina a la quinasa de la cadena ligera de miosina.
6. El movimiento *in vitro* de los microtúbulos requería ATP y era inhibido mediante el análogo de ATP no hidrolizable AMP-PNP. Así, los orgánulos permanecieron unidos a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP, sugiriendo que las proteínas motoras responsables del movimiento de orgánulos también podrían estar unidas.
7. La colcemida inhibe la polimerización de microtúbulos e inhibiría el transporte de las vesículas secretoras sobre los microtúbulos.
8. La γ-tubulina juega un papel clave en la formación de centros organizadores de microtúbulos. La γ-tubulina se asocia con otras proteínas para formar el complejo del anillo de γ-tubulina, que funciona como semilla para la nucleación de nuevos microtúbulos.
9. Los filamentos intermedios no son necesarios para el desarrollo de células en cultivo, con lo cual el ARNsi contra la vimentina no tendría efecto.
10. Los dímeros de filamentos intermedios citoesqueléticos se ensamblan de forma escalonada y antiparalela para formar tetrámeros, que a continuación pueden ensamblarse extremo con extremo para constituir protofilamentos. Dado que se ensamblan a partir de tetrámeros antiparalelos, los filamentos intermedios no tienen extremos diferenciados y son apolares.
11. Mediante la unión de dobletes de microtúbulos presentes en los cilios, la nexina convierte el desplazamiento de los microtúbulos individuales en un movimiento de flexión que desencadena el batido de los cilios. Si fuese eliminado, los microtúbulos simplemente se desplazarían entre sí.

CAPÍTULO 14

1. Las proteínas periféricas de membrana pueden retirarse de la membrana mediante un lavado fuerte en sales o mediante soluciones con un pH extremo que afectan a la bicapa fosfolipídica. Las proteínas integrales de membrana sólo pueden extraerse de las membranas mediante detergentes que desorganizan la bicapa de fosfolípidos.
2. Frye y Edidin fusionaron células de ratón y células humanas y examinaron la distribución de las proteínas de membrana después de marcarlas con anticuerpos anti-ratón y anti-humano conjugados con sondas fluorescentes. Inmediatamente después de la fusión, las proteínas se localizaban en mitades diferentes de la superficie celular fusionada, pero después de una breve incubación a 37 °C las proteínas se entremezclaban, lo cual demostraba que las proteínas podían difundir lateralmente en una membrana fluida. Si se incubaban a 2 °C, las proteínas permanecían separadas porque la membrana no es fluida a esta temperatura.
3. Las balsas lipídicas son dominios definidos de la membrana que están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos. Se cree que las balsas lipídicas juegan papeles importantes en el movimiento celular, la endocitosis y la señalización celular.

4. Las proteínas transmembrana que se asocian con el citoesqueleto no tienen libertad para moverse en la bicapa lipídica. Además de estar restringidas en su propia movilidad, las proteínas transmembrana que se fijan al citoesqueleto pueden actuar como barreras que limitan la movilidad de otras proteínas de membrana.
5. Dado que $C_0/C_i = 10$, el potencial de equilibrio de K^+ calculado a partir de la ecuación de Nernst es de aproximadamente –59mV. El potencial de membrana basal difiere del de potencial de equilibrio del K^+ porque los axones de calamar en estado basal son más permeables al K^+ que a otros iones.
6. La apertura de los receptores nicotínicos de acetilcolina es necesaria para la despolarización de la membrana en las células musculares. Así, el curare bloquea la contracción de las células musculares en respuesta a la acetilcolina.
7. El canal de K^+ contiene un filtro selectivo revestido por átomos de carbonil oxígeno. El poro tiene una apertura que justo permite el paso de iones K^+ deshidratados de los que todas las moléculas de agua han sido desplazadas como resultado de la asociación con los átomos de carbonil oxígeno. Los iones de Na^+ hidratados son demasiado pequeños para interaccionar con los átomos de carbonil oxígeno y permanecen asociados con las moléculas de agua. Este complejo es demasiado grande para pasar por el poro del canal.
8. La ingesta de glucosa en contra de su gradiente de concentración está acoplada al transporte de iones Na^+ en la dirección energéticamente favorable.
9. El gen *mdr* codifica para el transportador ABC que frecuentemente está sobreexpresado en células cancerosas. El transportador puede reconocer una diversidad de principios activos y bombearlos al exterior celular, confiriéndole resistencia a los medicamentos quimioterapéuticos.
10. La adición de un exceso de LDL no marcado redujo la unión del LDL marcado a la superficie de las células normales. Esto indicaba que el LDL marcado y no marcado, competían por un número limitado de sitios de unión en la superficie de células normales.
11. Dos tipos de mutaciones en el receptor de LDL resultando en la incapacidad de ingerir LDL fueron identificados en los pacientes de FH. Las células de la mayoría de los pacientes con FH no unían LDL, demostrando que un receptor específico era necesario para la ingesta. Otros receptores mutantes unían LDL, pero no se acumulaban en las invaginaciones, demostrando el papel de las invaginaciones revestidas en la endocitosis mediada por receptores.
12. La fagocitosis requiere una extensión basada en actina de la membrana plasmática, con lo que se bloquearía por la inhibición de la polimerización de actina. La endocitosis mediada por clatrina es independiente de la actina y no resultaría afectada.

CAPÍTULO 15

1. Las bacterias grampositivas poseen una sola membrana —la membrana plasmática— rodeada por una gruesa pared celular. Las bacterias gramnegativas tienen, por tanto, una membrana plasmática y una membrana externa, separadas por una fina pared celular.
2. Las proteínas de citoesqueleto de bacterias determinan la forma de la célula mediante el control de la síntesis de la pared celular.
3. La pared celular vegetal rígida previene el hinchamiento de las células y permite la acumulación de la presión de turgencia.
4. Las hemicelulosas son polisacáridos ramificados que se unen mediante enlaces de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa. Esta interacción estabiliza las microfibrillas de celulosa en fibras resistentes.
5. La localización correcta de estos transportadores de glucosa es necesaria para la función polarizada de las células epiteliales intestinales en la transferencia de glucosa desde el lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo. Las uniones estrechas impiden la difusión de estos transportadores entre dominios de la membrana plasmática, además de sellar los espacios entre células del epitelio.
6. La hidroxilisina estabiliza la triple hélice de colágeno mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas polipeptídicas. La inhibición de la lisil hidroxilasa disminuiría, por lo tanto, la estabilidad de las fibrillas de colágeno.
7. Los colágenos formadores de fibrillas son sintetizados como precursores solubles conocidos como procolágenos. Los procolágenos poseen segmentos no helicoidales en sus extremos, que previenen el ensamblaje de fibrillas. Sólo después de que el procolágeno sea secretado al exterior celular, los segmentos no helicoidales son eliminados y las fibrillas son ensambladas.
8. Los GAG contienen residuos de azúcares acídicos, que son modificados mediante la adición de grupos sulfatos. Esto imparte una elevada carga negativa a los GAG, de modo que pueden unirse a iones de carga positiva y atrapar moléculas de agua de los geles hidratados.
9. El péptido probablemente desorganiza las uniones estrechas, permitiendo así la libre difusión del transportador entre los dominios apicales y basolaterales de la membrana plasmática.
10. Puesto que las cadherinas E median la adhesión selectiva de las células epiteliales, la sobreexpresión de una versión dominante negativa desorganizaría las interacciones entre células vecinas.
11. El dominio citoplásmico de la integrina $\alpha_6\beta_4$ es necesario para su interacción con el citoesqueleto de filamentos intermedios a través de la plectina. La mutación, por lo tanto, desorganizaría la formación del hemidesmosoma y desencadenaría un descenso de la interacción célula-matriz.
12. Las sinapsis eléctricas están especializadas en las uniones *gap* que se encuentran en las células nerviosas. Permiten el paso rápido de iones entre células, conduciendo así el impulso nervioso.
13. Las uniones *gap* y los plasmodesmas son similares en que ambos proporcionan canales entre los citoplasmas de células adyacentes. Probablemente sean análogos en lugar de estructuras homólogas entre animales y plantas, puesto que sus estructuras son extremadamente distintas.

CAPÍTULO 16

1. En la señalización paracrina, las moléculas liberadas por una o unas pocas células afectan a las células cercanas. En la señalización endocrina, las hormonas son transportadas por el cuerpo para actuar sobre una célula diana que tiene un receptor para esa hormona.
2. Las moléculas hidrofóbicas como las hormonas esteroideas pueden difundir a través de la membrana plasmáti-

ca y se unen a receptores citosólicos o nucleares. Las moléculas hidrofílicas (como las hormonas peptídicas) no pueden cruzar la membrana plasmática, de modo que actúan uniéndose a receptores presentes en la superficie celular.

3. La aspirina inhibe a la enzima ciclooxigenasa, que cataliza el primer paso de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico.
4. La inhibición de la AMPc fosfodiesterasa dará lugar a un nivel elevado de AMPc, que estimulará la proliferación celular.
5. La molécula recombinante funcionaría como un receptor de epinefrina acoplado a G_i. La epinefrina, por tanto, inhibiría la adenilil ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc intracelulares. La acetilcolina no tendría efecto, puesto que no uniría al receptor recombinante.
6. La proteína fosfatasa 1 defosforila residuos de serina que son fosforilados por la proteína quinasa A. Los genes inducibles por AMP cíclico son activados por CREB, que es fosforilado por la proteína quinasa A, de modo que la sobreexpresión de proteína fosfatasa 1, inhibiría su inducción. Sin embargo, la proteína fosfatasa 1 no afectaría a la actividad de canales controlados por la unión de AMP cíclico, puesto que estos canales son abiertos directamente mediante la unión de AMPc en lugar de mediante fosforilación proteica.
7. Los monómeros de PDGF no inducirán la dimerización del receptor. Puesto que esto es el primer paso en la señalización de las proteína-tirosina quinasas receptoras, los monómeros no serán capaces de activar el receptor de PDGF.
8. El receptor truncado actuaría como un mutante dominante negativo porque dimerizaría con el receptor normal. Los dímeros serían inactivos porque serían incapaces de llevar a cabo la fosforilación cruzada.
9. Las JAK fosforilan y activan las STAT en respuesta a la señalización por citoquinas. La expresión de un dominante negativo de JAK inhibiría la activación de STAT y bloquearía la inducción génica.
10. Se necesita un GEF para la activación de Ras, con lo cual el ARNsi contra GEF inhibiría la inducción del gen temprano inmediato.
11. Akt fosforila la proteína quinasa GSK-3 que regula la traducción del factor eIF2B. Además, Akt regula la proteína quinasa mTOR/raptor, que regula la traducción mediante la fosforilación de la S6 quinasa y la proteína de unión a eIF4E, 4E-BP1.
12. La mutación probablemente altera el sitio de ubiquitinación de la β-catenina, desencadenando su estabilización y acumulación nuclear. En el núcleo la β-catenina forma un complejo con los factores de transcripción Tcf e induce la expresión génica.

CAPÍTULO 17

1. Las células en G_0 y G_1 poseen la misma cantidad de ADN ($2n$) y ambas son metabólicamente activas. Las células en G_0 difieren de las células en G_1 en que permanecen en un estado inactivo y no proliferan a no ser que sean estimuladas para retomar el ciclo celular.
2. La detención del ciclo celular en los puntos de control G_1 y S permite tiempo para que el ADN dañado sea reparado antes de ser replicado. La detención en el punto de control de G_2 permite tiempo para que las roturas de ADN u otros daños sean reparados antes de que se produzca la mitosis, impidiendo que el ADN dañado pase a las células hijas.
3. Las Cdk están reguladas por cuatro mecanismos diferentes: la asociación con las ciclinas, la activación por fosforilación, las fosforilaciones inhibitorias, y la asociación con los inhibidores de Cdk.
4. Una célula hija recibiría dos copias del cromosoma mal alineado, la otra célula hija no recibiría ninguna.
5. El complejo Cdk7/ciclina H es una quinasa activadora de Cdk que también es necesaria para la iniciación de la transcripción por ARN polimerasa II. Así, la inhibición de Cdk7 desencadenaría la detención del ciclo celular y la inhibición de la transcripción.
6. En una célula normal, la sobreexpresión de p16 inhibiría la progresión del ciclo celular en el punto de restricción de G_1. Puesto que Rb es la principal diana de los complejos Cdk4, 6/ciclina D, una célula tumoral que carezca de un Rb funcional no se vería afectada por la sobreexpresión de p16.
7. La fosforilación de las lamininas nucleares es necesaria para la degradación de la lámina nuclear. La expresión de lamininas mutantes carecientes de un sitio de fosforilación por Cdk1 prevendría la degradación de la envuelta nuclear.
8. Cdk1/ciclina B fosforila varias proteínas estructurales directamente para alterar sus propiedades e iniciar la mitosis. Entre ellas se encuentran las condensinas, las lamininas nucleares, las proteínas de la matriz del Golgi, y las proteínas asociadas a los microtúbulos. Adicionalmente, Cdk1/ciclina B activa otras proteínas quinasas.
9. La anafase se iniciaría de forma normal. Sin embargo, Cdk1/ciclina B permanecería activo, de modo que la reformación de los núcleos, la descondensación cromosómica y la citocinesis no tendría lugar.
10. El complejo promotor de la anafase (APC/C) degrada la securina, desencadenando la activación de la proteasa separasa. La separasa a continuación degrada las cohesinas, rompiendo la unión entre las cromátidas hermanas.
11. Los oocitos de estos ratones no se detendrían en la metafase II.

CAPÍTULO 18

1. Las células apoptóticas son eliminadas eficientemente de los tejidos mediante fagocitosis, mientras que las células que mueren por lesiones agudas liberan su contenido al espacio extracelular y causan inflamación.
2. Las caspasas son sintetizadas como precursores inactivos largos que se activan en complejos (p. ej., el apoptosoma) o convertidos en enzimas activas mediante escisión proteolítica. Adicionalmente, las células contienen IAP (*in*hibidores de la *ap*optosis) que se asocian con las caspasas para inhibir su actividad.
3. La escisión de las lamininas por parte de las caspasas es necesaria para la fragmentación nuclear durante la apoptosis. Las lamininas mutadas no serán escindidas por las caspasas, y su expresión bloqueará la fragmentación nuclear.
4. Los miembros proapoptóticos multidominio de la familia Bcl-2 inducen apoptosis estimulando la liberación del citocromo *c* desde las mitocondrias, lo que desencadena la activación de las caspasas. La actividad de las proteínas proapoptóticas multidominio está regulada por los miembros antiapoptóticos y solo-BH3 de la familia Bcl-2.

5. La activación de p53 en respuesta al ADN lesionado desencadena la expresión de sus genes diana, que incluyen el inhibidor de Cdk p21 y los miembros solo-BH3 de la familia Bcl-2 PUMA y Noxa. p21 induce la detención del ciclo celular y los miembros solo-BH3 de la familia Bcl-2 inducen la apoptosis.
6. El Bad mutante no se mantendría en el estado activo por acción de la proteína 14-3-3, de modo que actuará induciendo la apoptosis.
7. Las proteínas 14-3-3 secuestran proteínas proapoptóticas, como los factores de transcripción Bad y FOXO, en un estado inactivo. Las células que expresan ARNsi contra proteínas 14-3-3, tendrán por lo tanto una tasa incrementada de apoptosis.
8. Ced-3 es la única caspasa de *C. elegans*. Su mutación desencadena la supervivencia de todas las células que normalmente morirían por apoptosis durante el desarrollo, y el ARNi contra Ced-3 tendría el mismo efecto.
9. Los tejidos contienen células madre y retienen la capacidad de proliferar y reemplazar las células diferenciadas.
10. La característica crítica de las células madre es su capacidad de autorrenovación. Se dividen para producir una célula hija que sigue siendo una célula madre y una célula hija que se divide y se diferencia.
11. Las células madre embrionarias son más fáciles de aislar y cultivar y son capaces de generar todos los tipos celulares diferenciados presentes en un organismo adulto.
12. Las células madre pluripotenciales inducidas pueden derivar directamente de células somáticas adultas sin que sea necesario emplear embriones.

CAPÍTULO 19

1. Un tumor benigno permanece confinado en su localización original, mientras que un tumor maligno puede invadir los tejidos normales de alrededor y metastatizar a otras partes del cuerpo.
2. A medida que un tumor progresa, las mutaciones ocurren en las células que forman parte de la población tumoral. Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a las células en las que ocurren, y les permiten crecer más que las otras células del tumor. Este proceso se denomina selección clonal, y desencadena el desarrollo continuado de tumores de crecimiento cada vez más rápido y más malignos.
3. Los estrógenos actúan como promotores de tumores aumentando la proliferación de células que responden a estrógenos como las células mamarias y endometriales.
4. La estimulación autocrina del crecimiento es un sistema de retroalimentación positiva en el que las células tumorales producen factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación.
5. Las células cancerosas son menos adhesivas que las células normales y no están tan estrechamente reguladas mediante interacciones célula-célula y célula-matriz. Adicionalmente, las células cancerosas secretan proteasas que degradan los componentes de la matriz extracelular, facilitando la invasión de los tejidos adyacentes. Finalmente, las células cancerosas secretan factores angiogénicos que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran a los tumores con oxígeno y nutrientes que facilitan las metástasis y perdiendo a las células cancerosas un acceso más fácil al sistema circulatorio.
6. Los pacientes de SIDA están inmunodeprimidos y son, por lo tanto, susceptibles a la infección por virus oncogénicos.
7. Un proto-oncogén puede ser expresado a niveles anómalos o en tipos celulares anómalos. Estos cambios en la expresión pueden convertir un proto-oncogén en un oncogén a pesar de que se produzca una proteína estructuralmente normal. Un proto-oncogén puede ser activado de este modo mediante una translocación que lo pone bajo el control de un promotor activo o mediante fenómenos de amplificación génica.
8. *INK4* codifica el inhibidor p16 de Cdk, que inhibe los complejos Cdk4, 6/ciclina D. Dado que la fosforilación de Rb es la principal diana de Cdk4, 6/ciclina D, la sobreexpresión de p16 no tendrá ningún efecto en aquellas células en las que Rb haya sido inactivada.
9. *p53* es necesario para la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al ADN lesionado inducido mediante la radiación ionizante. Así, los tumores con genes de *p53* silvestres serán más sensibles a la radiación.
10. Imatinib es un inhibidor específico de la proteína quinasa Bcr/Abl expresada en las células de leucemia mieloide crónica. La inhibición de Bcr/Abl bloquea la proliferación de estas células tumorales. La resistencia a imatinib es causada la mayoría de las veces por mutaciones en Bcr/Abl que impiden la unión del principio activo.
11. Se cree que la proliferación y supervivencia de las células tumorales se hace dependiente de los oncogenes activados, a la vez que otras vías de señalización cobran una importancia secundaria. Esta dependencia por las células tumorales de los oncogenes activados se ha denominado adicción oncogénica. Sugiere que principios activos frente a un oncogén activado se dirigirían selectivamente contra las células tumorales, mientras que las células normales serían capaces de compensar empleando vías de señalización alternativas.
12. No. La MEK es posterior a Raf, con lo cual la activación oncogénica de Raf no tendría efecto si se inhibe la MEK.

Glosario

5′-trifosfato de adenosina (ATP) Véase ATP.
abl Proto-oncogén que codifica una proteína-tirosina quinasa y que es activado por la translocación cromosómica en la leucemia mieloide crónica.
acetilación de histonas Modificación de histonas por la adición de grupos acetilo a residuos específicos de lisina.
ácido abscísico Hormona vegetal.
ácido desoxirribonucleico (ADN) Material genético de la célula.
ácido graso Cadena larga hidrocarbonada generalmente unida a un grupo carboxílico (COO^-).
ácido retinoico Molécula señalizadora sintetizada a partir de la vitamina A.
ácido ribonucleico (ARN) Polímero de ribonucleótidos.
ácidos nucleicos antisentido Acido nucléico (ARN o ADN) que son complementarios a un ARNm de interés y emplean para bloquear la expresión génica.
acoplamiento quimiosmótico Generación de ATP a partir de la energía almacenada en un gradiente protónico a través de una membrana.
actina Proteína abundante de 43-kd que polimeriza para formar filamentos del citoesqueleto.
actina [F] filamentosa Monómeros de actina polimerizados en filamentos.
actina [G] globular Monómeros de actina que no han sido ensamblados en filamentos.
α-actinina Proteína de unión a la actina que entrelaza los filamentos de actina para formar haces contráctiles.
activador transcripcional Factor de transcripción que estimulan a la misma.
acuaporina. Proteína de canal a través de la cual el agua atraviesa la membrana plasmática con gran rapidez
adaptina Proteína de unión a receptores de membrana que media en la formación de vesículas revestidas por clatrina.
adenina Purina que se empareja tanto con timina como con uracilo.
adenilato ciclasa Enzima que cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP.
adenoma Tumor benigno que aparece en el epitelio glandular.
Adenovirus. Virus tumoral de ADN muy conocido.
ADF/cofilina Familia de proteínas de unión a la actina que desensamblan los filamentos de actina.
adhesión focal Sitio de unión de las células a la matriz extracelular en el que las integrinas se unen a haces de filamentos de actina.
adicción oncogénica La dependencia de las células cancerosas de la actividad continuada de los oncogenes.
ADN complementario (ADNc) Molécula de ADN que es complementaria a una molécula de ARNm, sintetizada *in vitro* por la transcriptasa inversa.
ADN glicosilasa Enzima de reparación del ADN que corta la unión de una purina o pirimidina a la desoxirribosa del esqueleto de una molécula de ADN.
ADN ligasa Enzima que sella roturas en las hebras de ADN.
ADN polimerasa Enzima que cataliza la síntesis de ADN.
ADN satélite ADN de secuencia sencilla repetitiva con una gran densidad que difiere de la mayoría del ADN genómico.
ADNc Molécula de ADN que es complementaria a una molécula de ARNm y es sintetizada en vitro por la transcriptasa inversa.
aislante Una secuencia que divide la cromatina en dominios independientes y previene que un *enhancer* o potenciador actúe sobre un promotor de un dominio separado.
Akt Proteína-serina/treonina quinasa que se activa por PIP^3 y que desempeña un papel clave en la señalización de la supervivencia celular.
alelo Copia de un gen.
almidón Polímero de restos de glucosa que es la principal reserva de carbohidratos en las plantas.
amiloplasto Plástido que almacena almidón.
aminoácido Bloques de construcción monoméricos de las proteínas que constan de un átomo de carbono unido a un grupo carboxílico, a un grupo amino, a un átomo de hidrógeno y a una cadena lateral específica.
aminoacil ARNt sintetasa Enzima que une un aminoácido específico a una molécula de ARNt que porta la secuencia correcta anticodón.
AMP cíclico (AMPc) Adenosina monofosfato en la que el grupo fosfato está unido con enlace covalente a los átomos de carbono 3′ y 5′, formando una estructura cíclica; importante segundo mensajero en la respuesta de las células a una variedad de hormonas.
AMPc fosfodiesterasa Enzima que degrada el AMP cíclico.

amplificación génica Aumento en el número de copias de un gen como resultado de una replicación repetida de una región de ADN.
anafase Fase de la mitosis durante la cual las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso.
anafase A Movimiento de los cromosomas hijos hacia los polos del huso durante la mitosis.
anafase B Separación de los polos del huso durante la mitosis.
anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) Glicolípidos que contienen fosfatidilinositol y que anclan proteínas a la cara externa de la membrana plasmática.
anfipática Molécula que posee tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas.
angiogénesis Formación de nuevos vasos sanguíneos.
anillo contráctil Estructura de actina y miosina II que se forma por debajo de la membrana plasmática durante la mitosis y media la citocinesis.
anquirina Proteína que une espectrina y conecta el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática.
anticodón Secuencia nucleotídica del ARN de transferencia que forma pares de bases complementarios con una secuencia codón del ARN mensajero.
anticuerpo Proteína producida por los linfocitos B que se une a una molécula no propia.
anticuerpo monoclonal Anticuerpo producido por una línea clonal de linfocitos B.
antígeno Molécula contra la que se dirige el anticuerpo.
antiporte Transporte de dos moléculas en direcciones opuestas a través de la membrana.
aparato de Golgi Orgánulo citoplasmático implicado en el procesamiento y clasificación de proteínas y lípidos. En células vegetales, es también el lugar de síntesis de los polisacáridos de la pared celular.
apoptosis Proceso activo de muerte celular programada, caracterizado por la rotura del ADN cromosómico, la condensación de la cromatina y la fragmentación tanto del núcleo como de la célula.
apoptosoma Complejo proteico en el que se activa la caspasa-9 para iniciar la apoptosis tras la liberación del citocromo c de las mitocondrias.
Arabidopsis thaliana Planta pequeña, con floración, empleada como modelo en biología molecular vegetal y en biología del desarrollo vegetal.
ARF Proteína de fijación del GTP necesaria para la gemación de vesículas desde la red del *trans*-Golgi.
armadillo Familia de proteínas que contiene la ß-catenina, encargadas de unir las cadherinas al citoesqueleto en las uniones intercelulares estables.
ARN de transferencia (ARNt) Molécula de ARN que actúan como adaptadores entre los aminoácidos y el ARNm durante la síntesis proteica.
ARN no codificante largo ARN de más de 200 nucleótidos que regula la expresión génica.
ARN pequeño de interferencia (ARNsi) ARN bicatenario no codificante corto que actúa en la vía de interferencia del ARN.
ARN pequeño nuclear (ARNsn) ARN nuclear que varían en tamaño desde las 50 a las 200 bases.
ARN pequeño nucleolares (ARNsno) ARN pequeño presente en el nucléolo que funcionan en el procesamiento de pre-ARNr.
ARN polimerasa Enzima que cataliza la síntesis del ARN.
ARN ribosomal (ARNr) ARN componente de los ribosomas.
ARN de SRP Componente citoplásmico pequeño de ARN de la SRP.
ARNm (ARN mensajero) Molécula de ARN que sirve de molde para la síntesis de proteínas.
ARNr (ARN ribosómico) ARN que forma parte de los ribosomas.
ARNt (ARN de transferencia) Molécula de ARN que funciona como adaptador entre los aminoácidos y el ARNm en la síntesis de proteínas.
arqueobacteria Uno de los dos grupos principales de procariotas; muchas especies de arqueobacterias viven en condiciones extremas similares a aquellas que existían en los orígenes de la tierra.
β-arrestina Una proteína reguladora que termina la señalización desde los receptores acoplados a proteínas G, además de estimular otras vías de señalización corriente abajo.
ATM Una proteína quinasa que reconoce el ADN lesionado y desencadena la detención del ciclo celular.
ATP (adenosina 5′-trifosfato) Nucleósido trifosfato compuesto por adenina que sirve de almacén de energía libre en la célula.
ATP sintetasa Complejo proteico asociado a la membrana que acopla el transporte de protones, energéticamente favorable, a través de una membrana, a la síntesis de ATP.
ATPasa Na^+-K^+ Véase bomba Na^+-K^+.
ATR Una proteína quinasa semejante a ATR que desencadena la detención del ciclo celular en respuesta al ADN lesionado.
aurora quinasa Una familia de proteínas quinasas implicada en la formación del huso mitótico, la función del cinetócoro y la citocinesis.
autofagia Degradación de proteínas citoplasmáticas y orgánulos al ser englobadas en vesículas citoplasmáticas que se fusionan con lisosomas.
autofagosoma Vesícula que contiene orgánulos internos encerrados por fragmentos de membranas citoplasmáticas que se fusiona con los lisosomas.
autofosforilación Una reacción en la que una proteína quinasa cataliza su propia fosforilación.
autorradiografía Detección de moléculas marcadas radioisotópicamente por exposición a una película de rayos X.
auxina Hormona vegetal que controla muchos aspectos del desarrollo de la planta.
axonema Estructura fundamental de cilios y flagelos compuesta por un par central de microtúbulos rodeado por nueve dobletes de microtúbulos.

bacteriófago Virus bacteriano.
baculovirus Virus empleado frecuentemente como vector de expresión para la producción de proteínas eucarióticas en células de insecto.
balsa lipídica Dominio discreto de la membrana plasmática formado por agrupación de moléculas de colesterol y esfingolípidos.
barril-β Dominio transmembrana formado por el plegamiento de láminas en una estructura con forma de barril.
Bcl-2 Miembro de la familia de proteínas que regulan la muerte celular programada.
biblioteca de ADN recombinante Colección de clones de ADNc o genómico.
biblioteca de ADNc Colección de clones recombinantes de ADNc.
biblioteca genómica Colección de clones de ADN recombinante que, de forma colectiva, contienen el genoma de un organismo.
bicapa fosfolipídica Estructura básica de las membranas biológicas, donde las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos están inmersas en el interior de la membrana, y sus grupos polares se exponen a la solución acuosa a ambos lados de dicha membrana.

bioinformática Uso de métodos computacionales para analizar grandes cantidades de datos biológicos, como las secuencias genómicas.
biología de sistemas Un nuevo campo de la biología en el que los enfoques experimentales a gran escala se combinan con el análisis cuantitativo y la modelación para el estudio de los sistemas biológicos complejos.
bomba de Na^+-K^+ Bomba iónica que transporta Na^+ fuera de la célula y K^+ dentro de la célula.
bomba iónica Proteína que acopla la hidrólisis de ATP al transporte de iones a través de una membrana.
borde en cepillo Superficie de una célula (p. ej., una célula epitelial del intestino) que contiene una capa de microvellosidades.
brasinosteroide Hormona esteroídica de plantas.

cadena de transporte electrónico Serie de transportadores mediante los cuales los electrones se transportan desde un estado de energía superior a uno inferior.
cadherinas Molécula de adhesión celular que forma uniones estables célula-célula en las uniones adherentes y en los desmosomas.
Caenorhabditis elegans Nematodo empleado como modelo pluricelular sencillo en biología del desarrollo.
caja TATA Secuencia reguladora de ADN encontrada en los promotores de muchos genes eucarióticos transcritos por la ARN polimerasa II.
callo Masa indiferenciada de células vegetales en cultivo.
CaM quinasa Miembro de una familia de proteína quinasas que se activan por la unión de Ca^{2+}/calmodulina.
canal activado por ligando Canal iónico que se abren en respuesta a la unión de moléculas señalizadoras.
canal iónico Proteína que interviene en el tránsito rápido de iones a través de una membrana, mediante la formación de poros abiertos a través de la bicapa fosfolipídica.
canales activados por voltaje Canal iónico que se abren en respuesta a variaciones en el potencial eléctrico.
calmodulina Proteína de fijación del calcio.
cáncer Tumor maligno.
caperuza de 5′ metilguanosina Estructura constituida por GTP y azúcares metilados que se añade al extremo 5′ de los ARNm de los eucariotas.
carbohidrato Molécula de fórmula $(CH_2O)_n$. Los carbohidratos incluyen, tanto azúcares simples, como polisacáridos.
carcinógeno Agente inductor de cáncer.
carcinoma Cáncer de células epiteliales.
cardiolipina Fosfolípido que contiene cuatro cadenas hidrocarbonadas.
carioferina Receptor de transporte nuclear.
caspasas Miembro de una familia de proteasas que ocasionan la muerte celular programada.
catenina Grupo de proteínas citoplasmáticas (como α-catenina y β-catenina) que unen los filamentos de actina con cadherinas en las uniones adherentes.
catalasa Enzima que descompone peróxido de hidrógeno.
caveolas Pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática que pueden estar implicadas en la endocitosis.
caveolina Una proteína que interacciona con las balsas lipídicas y forma las caveolas.
CCND1 El gen que codifica para la ciclina D1, que es un oncogén en una diversidad de cánceres humanos.
Cdc42 Miembro de la subfamilia Rho de proteínas de unión al GTP de bajo peso molecular.
Cdk Miembro de una familia de proteína quinasas dependiente de ciclinas que controlan el ciclo celular en la célula eucariótica.
Cdk1 Proteína-serina/treonina quinasa, que es un regulador clave de la mitosis en las células eucariotas.
Cdks Proteína quinasas ciclina dependientes que controlan el ciclo celular de las eucariotas. Véase también Cdk1.
célula de esclerénquima Tipo de célula vegetal caracterizadas por gruesas paredes celulares que proporcionan apoyo estructural a la planta.
célula eucariota Célula dotada de una envoltura nuclear, orgánulos citoplasmáticos y cromosomas lineales.
célula madre Célula que se divide para dar lugar a células hijas que pueden diferenciarse o permanecer como células madre.
célula madre totipotencial inducida Célula somática adulta que se reprograma en cultivo celular para comportarse como una célula madre embrionaria.
célula parenquimática Clase de célula vegetal responsable de la mayoría de las actividades metabólicas.
célula procariótica Célula que carece de una envoltura nuclear y orgánulos citoplasmáticos (bacteria)
células epidérmicas Tipo de célula que forma una capa protectora en las superficies de plantas y animales.
células epiteliales Tipo de célula que forma de láminas (tejido epitelial) que recubren la superficie del cuerpo y delimitan los órganos internos.
células madre embrionarias (ES) Células cultivadas a partir de embriones tempranos.
celulosa Principal componente estructural de la pared celular vegetal, polímero lineal de restos de glucosa unidos mediante enlaces glicosídicos β(1→4).
celulosa sintasa Enzima que cataliza la síntesis de celulosa.
CENP-A Véase H3 centromérica
centrifugación de velocidad Separación de partículas basadas en sus tasas de sedimentación.
centrifugación diferencial Método empleado para separar los componentes de las células en base a su tamaño y densidad.
centrifugación por equilibrio Separación de partículas en función de la densidad, mediante centrifugación, hasta el equilibrio en un gradiente de una sustancia densa.
centrifugación por gradiente de densidad Método de separación de partículas por centrifugación a través de gradiente de una sustancia densa, como sacarosa o cloruro de cesio.
centriolo Estructura cilíndrica consistente en nueve tripletes de microtúbulos en los centrosomas de la mayoría de las células animales.
centro activo Región de una enzima que une sustratos y cataliza una reacción enzimática.
centro de organización de microtúbulos Punto de anclaje cerca del centro de la célula desde donde la mayoría de los microtúbulos se extienden hacia fuera.
centrómero Región del cromosoma especializada que conecta las cromátidas hermanas y las fija al huso mitótico.
centrosoma Centro de organización microtubular en células animales.
chaperona Proteína que facilita el correcto pliegue o ensamblaje de otras proteínas.
chaperonina Familia de proteínas de choque térmico dentro de las cuales se produce el pliegue proteico.
cianobacteria Procariotas mayores y más complejos en los cuales se cree que evolucionó la fotosíntesis.
ciclina Miembro de una familia de proteínas que regulan la actividad de Cdks y controlan la progresión a través del ciclo celular.
ciclina G_1 (Cln) Ciclina de levadura que controlan el paso a través de START.
ciclo de Calvin Serie de reacciones mediante las cuales seis moléculas de CO_2 se transforman en glucosa.

ciclo de Krebs Ver ciclo de ácido cítrico.
ciclo del ácido cítrico Serie de reacciones en las cuales el acetil CoA se oxida a CO_2. Ruta central del metabolismo oxidativo.
ciclo del glioxilato Conversión de ácidos grasos a carbohidratos en vegetales.
cilio Proyección de la membrana plasmática, constituida por microtúbulos, que mueve a la célula a través de fluidos o al fluido sobre la célula.
cinasa de comprobación Proteína-cinasa (Chk1 o Chk2) que detiene el ciclo celular en respuesta al ADN dañado.
cinetocoro Estructura especializada constituida por proteínas sujetas a un centrómero y que interviene en la fijación y movimiento de los cromosomas a lo largo del huso mitótico.
cinturón de adhesión Estructura con forma de cinturón en torno a las células epiteliales, en las que un haz contráctil de filamentos de actina está asociado a la membrana plasmática.
citocalasina Fármaco que bloquea la elongación de los filamentos de actina.
citocinesis División de una célula tras la mitosis o meiosis.
citocromo *c* Una proteína periférica de la membrana mitocondrial que transporta electrones durante la fosforilación oxidativa.
citocromo oxidasa Complejo proteico de la cadena de transporte electrónico que acepta electrones desde el citocromo *c* y los transfiere al O_2.
citoesqueleto Red de filamentos proteicos que se extiende a través del citoplasma de las células eucariotas. Proporciona el armazón estructural de la célula y es responsable de los movimientos celulares.
citómetro de flujo Instrumento que mide la intensidad de la fluorescencia de células individuales.
citoquina Factor de crecimiento que interviene en la regulación de las células sanguíneas y los linfocitos.
citoquinina Hormona vegetal que regula la división celular.
citosina Pirimidina que se empareja con guanina.
clatrina Proteína que reviste la superficie citoplasmática de las membranas celulares, se ensambla en celosías en forma de cesta y dirige la formación de vesículas.
Cln Ciclina de levaduras que controla el paso a través de START.
clon molecular Véase molécula recombinante.
clonación molecular Inserción de un fragmento de ADN de interés en una molécula de ADN (vector) que es capaz de replicación independiente en una célula huésped.
clonación reproductiva Empleo de la transferencia nuclear para crear un organismo clonado.
clonación terapéutica Procedimiento en el que la transferencia nuclear en oocitos podría utilizarse para producir células madre embrionarias para su uso en la terapia de trasplante.
clorofila Pigmento fotosintético principal de células vegetales.
cloroplasto Orgánulo responsable de la fotosíntesis en las células de plantas y algas verdes.
***c*-myc** Protooncogén que codifica un factor de transcripción y frecuentemente es activado por la translocación cromosómica o la amplificación génica en tumores humanos.
coactivador Proteína que interacciona con un factor de transcripción para estimular la transcripción
código de histonas Combinaciones de modificaciones específicas de las histonas que se cree que regulan la actividad transcripcional de la cromatina.
código genético Correspondencia entre tripletes de nucleótidos y aminoácidos en las proteínas.
codón Unidad básica del código genético; uno de los 64 tripletes de nucleótidos que codifican un aminoácido o una secuencia de terminación.
coenzima Moléculas orgánicas de bajo peso molecular que colaboran con las enzimas en la catálisis de las reacciones biológicas.
coenzima A (CoA) Coenzima que actúa como transportador de grupos acetilo en reacciones metabólicas.
coenzima Q Pequeña molécula liposoluble que transporta electrones entre complejos proteicos en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.
cohesinas Proteína que mantiene la conexión entre cromátidas hermanas.
cola de poli-A Extensión de aproximadamente 200 nucleótidos de adenina que se añade a los extremos 3′ de los ARNm eucariotas.
colágeno Principal proteína estructural de la matriz extracelular.
colcemida Fármaco que inhibe la polimerización de microtúbulos.
colchicina Fármaco que inhibe la polimerización de microtúbulos.
colénquima Células vegetales caracterizadas por gruesas paredes celulares; proporcionan apoyo estructural a la planta.
colesterol Lípido constituido por cuatro anillos hidrocarbonados. El colesterol es el principal constituyente de las membranas plasmáticas de células animales y es el precursor de hormonas esteroideas.
complejo ARP 2/3 Complejo proteico que se une a los filamentos de actina e inicia la formación de ramificaciones.
complejo de anillo de γ-tubulina Un complejo proteico que nuclea la formacón de microtúbulos.
Complejo de Golgi Véase Aparato de Golgi.
complejo de orientación Complejo proteína que dirige las proteínas hacia los cloroplastos.
complejo de unión Región de contacto célula-célula que contiene una unión estrecha, una unión adherente y un desmosoma.
complejo del citocromo *bf* Complejo proteico de la membrana del tilacoide que transporta electrones durante la fotosíntesis.
complejo del origen de replicación (ORC) Complejo proteico que inicia la replicación del ADN en los puntos de origen en levaduras.
complejo del poro nuclear Gran estructura que forma un canal de transporte a través de la envuelta nuclear.
complejo focal Un pequeño grupo de integrinas que se unen a la matriz extracelular que inicia la formación de una adhesión focal.
complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) Ubiquitina ligasa que desencadena la progresión de la metafase a la anafase mediante la señalización de la degradación de ciclina B y cohesinas.
complejo silenciador de la transcripción inducido por ARN (RITS) Complejo de proteínas al que se unen ARNsi y que inhibe la transcripción de genes homólogos.
complejo sinaptonémico Estructura proteica en forma de cremallera que se forma a lo largo de los cromosomas homólogos emparejados durante la meiosis.
complejo Tic Complejo de translocación proteica de la membrana interna del cloroplasto.
complejo Tim Complejo de translocación proteica de la membrana mitocondrial interna.
complejo Toc Complejo de translocación proteica de la membrana externa del cloroplasto.

complejo Tom Complejo de translocación proteica de la membrana mitocondrial externa.
complejo WASP/Scar Un complejo proteico que estimula la ramificación de los filamentos de actina.
condensina Un complejo proteico que dirige la condensación cromosómica durante la metafase.
conexina Miembro de la familia de proteínas transmembrana que forma las uniones de tipo *gap*.
conexón Un cilindro formado por seis conexinas en la membrana plasmática.
COPI y **COPII** Las dos proteínas diferentes de la clatrina que recubren las vesículas de transporte (COP indica proteína de la envuelta: *coat protein*).
corrección de pruebas Retirada selectiva de bases mal apareadas por parte de la ADN polimerasa.
correpresor Proteína que se asocia con represores para inhibir la expresión génica, a menudo modificando la estructura de la cromatina.
córtex celular Red de actina subyacente a la membrana plasmática.
corticoesteroide Hormonas esteroideas producidas por la glándula adrenal.
cósmido Vector que contiene secuencias del bacteriófago λ, secuencias de resistencia a antibióticos, y un origen de replicación. Puede acomodar grandes insertos de ADN de incluso 45 kb.
CREB Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico. Un factor de transcripción que se activa por acción de la proteína quinasa dependiente de AMPc.
cremallera de leucina Dominio de dimerización proteico que contiene restos repetidos de leucina; se encuentra en muchos factores de transcripción.
crestas Pliegues de la membrana interna mitocondrial que se extienden a la matriz.
criofractura Método de microscopia electrónica que consiste en que las muestras se congelan en nitrógeno líquido y después se fracturan para escindir la bicapa lipídica, mostrando así las caras internas de las membranas celulares.
cristalografía de rayos X Método en el que el patrón de difracción de rayos X es utilizado para determinar la organización de los átomos individuales dentro de una molécula.
cromatina Complejo fibroso de ADN eucariota y proteínas histonas. Véase histonas, nucleosoma y cromatosoma.
cromatografía de afinidad de ADN Método empleado para aislar proteínas de unión al ADN basado en su unión a secuencias específicas de ADN.
cromatosoma Subunidad de cromatina que consta de 166 pares de bases de ADN enrolladas alrededor de un núcleo de histona y mantenidas en su posición por un conector a la histona.
cromoplasto Plástido que contiene carotenoides.
cromosoma artificial bacteriano (BAC) Tipo de vector empleado en la clonación de fragmentos grandes de ADN en bacterias.
cromosoma artificial de levadura (YAC) Vector que puede ser replicado como un cromosoma en células de levadura y que puede acomodar inserciones muy grandes de ADN (de cientos de kb).
cromosoma artificial P1 (PAC) Vector empleado para la clonación de fragmentos grandes de ADN en *E. coli*.
cromosoma politénico Cromosoma gigante encontrado en algunos tejidos de *Drosophila* que surge de la replicación repetida de hebras de ADN que no se separan entre sí.
cromosomas Portador de genes, consistentes en moléculas largas de ADN y proteínas asociadas.
cuerpo basal Estructura similar a un centriolo que inicia el crecimiento de los microtúbulos axonémicos y ancla los cilios y flagelos a la superficie de la célula.
cuerpo nuclear Orgánulo diferenciado en el interior del núcleo.
cuerpo polar Célula pequeña formada por la división celular asimétrica que sigue a la meiosis de los oocitos.
cultivo primario Cultivo celular establecidos a partir de un tejido.

deaminasa inducida por activación (DIA) Una enzima expresada en linfocitos B que deamina los residuos de citosina en el ADN para formar uracilo en las regiones variables de los genes de inmunoglobulinas. DIA es necesaria tanto para la recombinación de cambio de clase como para la hipermutación somática.
decaimiento mediado por ARNm sin sentido Degradación de ARNm que carecen de marcos de lectura abiertos completos.
degradación asociada al ER (ERAD) Proceso por el que se identifican las proteínas mal plegadas en el ER y se devuelven al citosol para ser degradadas por el sistema ubicuitina-proteasoma.
desmina Una proteína de los filamentos intermedios expresada en células musculares.
desmocolina Tipo de cadherina transmembrana que une los citoesqueletos de filamentos intermedios de células adyacentes en los demosomas.
desmogleína Tipo de cadherina transmembrana que une los citoesqueletos de filamentos intermedios de células adyacentes en los demosomas
desmosoma Región de contacto entre células epiteliales en la cual los filamentos de queratina se anclan a la membrana plasmática. Véase también hemidesmosoma.
2′-desoxirribosa Azúcar de cinco átomos de carbono que se encuentra en el ADN.
diacilglicerol Mensajero secundario formado por la hidrólisis de PIP_2, que activa la proteína quinasa C.
diacinesis Estadio final de la profase de la meiosis I durante la cual los cromosomas se condensan por completo y la célula progresa a metafase.
didesoxinucleótidos Nucleótido que carecen del grupo hidroxilo en 3′ y que se emplean como nucleótidos terminadores de cadena en la secuenciación de ADN.
difusión facilitada Transporte de moléculas a través de una membrana mediante proteínas transportadoras o de canal.
difusión pasiva Difusión de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de una bicapa fosfolipídica.
dímero de pirimidina Forma común de lesión en el ADN causada por la luz UV donde las pirimidinas adyacentes se unen para formar un dímero.
dinactina Una proteína que actúa junto con la dineína citoplasmática para desplazar mercancías sobre los microtúbulos.
dinamina Una GTPasa asociada a membrana implicada en la gemación vesicular.
dineína Proteína motora que migra a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo negativo.
dineína axonémica Tipo de dineína que se encuentra en cilios y flagelos.
dineína citoplásmica Forma de la dineína que se asocia con los microtúbulos en el citoplasma.
diploide Organismo o célula que porta dos copias de cada cromosoma.
diploteno Estadio de la meiosis I donde los cromosomas homólogos se separan longitudinalmente pero permanecen asociados en el quiasma.
distrofina Proteína citoesquelética de las células musculares.

doble-híbrido de levaduras Un método genético para detectar interacciones proteicas en células de levadura.
dogma central Concepto de que la información genética fluye de ADN a ARN y a proteínas.
dolicol fosfato Molécula lipídica del retículo endoplasmático sobre la que se unen los oligosacáridos para la glicosilación de las proteínas.
dominante Alelo que determina el fenotipo de un organismo cuando más de un alelo está presente.
dominio apical Superficie libre expuesta de una célula epitelial polarizada.
dominio basolateral Región superficial de una célula epitelial polarizada que está en contacto con células adyacentes o con la matriz extracelular.
dominio de dedo de cinc Tipo de dominio de unión de ADN constituido por bucles que contienen restos de cisteína e histidina, a los que se unen iones de cinc.
dominio PTB Dominio proteico que se une a los péptidos que contienen fosfotirosinas.
dominio SH2 Dominio proteico de aproximadamente 100 aminoácidos que se une a péptidos que contienen fosfotirosina.
dominios Regiones compactas y globulares de las proteínas que forma la unidad básica de la estructura terciaria.
Drosophila melanogaster Especie de mosca de la fruta comúnmente empleada para estudios de genética y desarrollo animal.

E2F Familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y la replicación del ADN.
ecdisona Hormona esteroidea de insectos que desencadena la metamorfosis.
ectodermo Capa externa germinal; da lugar a tejidos que incluyen la piel y el sistema nervioso.
ecuación de Nernst Relación entre concentración iónica y potencial de membrana.
edición de ARN Procesos de tratamiento del ARN distintos del *splicing* que alteran las secuencias de los ARMm que codifican proteínas.
eicosanoide Clase de lípidos, incluyendo prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos y leucotrienos, que actúan en señalización autocrina y paracrina.
elaioplastos Plásticos que almacenan lípidos.
elastina Componente principal de las fibras elásticas.
electroforesis en gel Método en el que se separan moléculas en base a su migración en un campo eléctrico.
electroforesis en gel bidimensional Un método para la separación de proteínas celulares basado en la carga y el tamaño.
electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida Método comúnmente usado para la separación de proteínas por electroforesis en gel en función de su tamaño.
electroporación Introducción de ADN en células mediante su exposición a un breve pulso eléctrico.
elemento barrera Ver aislante
elemento de control que actúa en *cis* Secuencia de ADN regulador que sirve de sitio de unión de proteínas y controla la transcripción de los genes adyacentes.
elemento de respuesta al AMPc (CRE) Secuencia reguladora que media la respuesta transcripcional de los genes diana al AMPc.
elemento de respuesta al suero (SRE) Secuencia reguladora que es reconocida por el factor de respuesta al suero y que media la inducción transcripcional de diversos genes inmediato-tempranos en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.
elemento semejante a un retrovirus Retrotransposón que es estructuralmente similar a un retrovirus.
elemento transponible Véase transposón.
Elk-1 Factor de transcripción que es activado por la fosforilación de ERK e induce la expresión de genes inmediatos-tempranos.
encaje inducido Modelo de acción enzimática en el que las configuraciones tanto de la enzima como del sustrato se modifican por la unión del sustrato.
encefalina Neuropéptido que actúa como un analgésico natural.
endocitosis Entrada de material extracelular en vesículas formadas a partir de la membrana plasmática.
endocitosis en fase fluida Entrada no selectiva de fluidos extracelulares durante la endocitosis.
endocitosis mediada por receptor Entrada selectiva de macromoléculas que se unen a receptores de la superficie celular, que se concentran en depresiones revestidas por clatrina.
endodermo Capa interna germinal; da lugar a los órganos internos.
endonucleasa AP Enzima de reparación del ADN que corta en puntos próximos a sitios apirimidínicos o apurínicos en el ADN.
endonucleasa de restricción Enzima que corta el ADN en una secuencia específica.
endorfina Neuropéptido que actúa como un analgésico natural.
endosoma Compartimento vesicular implicado en la clasificación y transporte a los lisosomas del material tomado por endocitosis.
endosimbiosis Relación simbiótica en donde una célula reside en el interior de una célula mayor.
energía de activación Energía requerida para elevar una molécula a su estado de transición para llevar a cabo una reacción química.
energía libre de Gibbs (G) Función termodinámica que combina los efectos de la entalpía y la entropía para predecir la dirección energéticamente favorable de una reacción química.
enfermedades del almacenamiento de los lisosomas Familia de enfermedades caracterizadas por la acumulación de material sin degradar en los lisosomas de los individuos afectados.
enlace de alta energía Enlace químico que libera una gran cantidad de energía libre cuando es hidrolizado.
enlace fosfodiéster Enlace entre el fosfato 5′ de un nucleótido y el hidroxilo 3′ de otro.
enlace glicosídico Enlace formado entre restos de azúcar en oligosacáridos o polisacáridos.
enlace peptídico Enlace que une aminoácidos en las cadenas polipeptídicas.
ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética Ensayo para la unión de una proteína a una secuencia específica de ADN.
entactina Proteína de la matriz extracelular que interacciona con las lamininas y con el colágeno de tipo IV en la lámina basal.
envoltura nuclear Barrera que separa el núcleo del citoplasma, compuesta de una membrana interna y otra externa, una lámina nuclear y complejos de poro nuclear.
enzima Proteína o ARN que catalizan reacciones biológicas.
ErbA Protooncogén que codifica un receptor de la hormona tiroidea.
***erb*B-2** Protooncogén que codifica un receptor proteína tirosina-quinasa que frecuentemente está amplificado en los carcinomas mamario y ovárico.

eritrocitos Glóbulos rojos sanguíneos.
ERbA Producto del proto-oncogén erbA. Receptor de la hormona tiroidea.
ERK Miembro de la familia de las quinasas MAP que juega un papel central en la proliferación celular inducida por factores de crecimiento.
***Escherichia coli* (*E. coli*)** Especie de bacterias que ha sido ampliamente utilizada como sistema modelo para la biología molecular.
escinucleasa Complejo proteico que escinde el ADN dañado durante la reparación por escisión de nucleótidos en bacterias.
esfingomielina Fosfolípido constituido por dos cadenas hidrocarbonadas unidas a una cabeza polar que contiene serina.
espectrina Una de las principales proteínas de fijación de la actina del córtex celular.
espectrometría de masas Un método para identificar compuestos basados en la determinación precisa de su masa. La espectrometría de masas se emplea habitualmente para la identificación de proteínas.
espliceosoma Complejo grandes de ARNsn y proteínas que catalizan el *splicing* de pre-ARNm.
estado de transición Estado energético elevado a través del cual deben pasar los sustratos durante el curso de una reacción enzimática.
estereocilio Microvellosidad especializada de las células auditivas.
ésteres de forbol Clase de promotores de tumores que estimulan a la proteína quinasa C al actuar como análogos del diacilglicerol.
estimulación autocrina del crecimiento Estimulación de la proliferación celular como resultado de la producción de un factor de crecimiento por parte de una célula que responde a dicho factor.
estrógeno Hormona esteroidea producida por los ovarios.
estroma Compartimento de los cloroplastos que se encuentra entre la envuelta y la membrana tilacoidea.
estructura cuaternaria Interacciones entre cadenas polipeptídicas en las proteínas que están constituidas por más de un polipéptido.
estructura primaria Secuencia de aminoácidos en una cadena polipeptídica.
estructura secundaria Disposición regular de los aminoácidos dentro de regiones localizadas de una cadena polipeptídica. Véase α-hélice y lámina β.
estructura terciaria Pliegue tridimensional de una cadena polipeptídica que confiere a la proteína su forma funcional.
etileno Hormona vegetal responsable de la maduración de la fruta.
etioplasto Estadio intermedio del desarrollo del cloroplasto en el que la clorofila no se ha sintetizado.
eubacterias Uno de los dos grupos principales de procariotas, incluyendo las especies más comunes de bacterias.
eucromatina Cromatina interfásica descondensada y transcripcionalmente activa.
exocisto Un complejo proteico en la membrana plasmática donde se produce la exocitosis.
exón Segmento de un gen que se incluye en un ARN sometido a corte y empalme.
exonucleasa Enzima que hidroliza moléculas de ADN tanto en dirección 5′ a 3′ como 3′ a 5′.
exportina Receptor proteico que reconoce señales de exportación nuclear y dirige el transporte desde el núcleo al citosol.
expresión transitoria Expresión de ADN plasmídico no integrado que se ha introducido en células cultivadas.
fábrica de replicación Gran complejo que contiene sitios agrupados de replicación del ADN en células eucariotas.
factor asociado a TBP (TAF) Polipéptido asociado con TBP en el factor de transcripción general TFIID.
factor citostático (CSF) Factor citoplásmico que detiene la meiosis del oocito en la metafase II.
factor de crecimiento Polipéptido que controla el crecimiento de la célula animal y su diferenciación.
factor de crecimiento anclado a la membrana Factor de crecimiento asociado a la membrana plasmática que actúan como moléculas de señalización durante el contacto célula-célula.
factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) Factor de crecimiento liberado desde las plaquetas en la coagulación sanguínea para estimular la proliferación de los fibroblastos.
factor de crecimiento epidérmico (EGF) Factor de crecimiento que estimula la proliferación celular.
factor de crecimiento neuronal (NGF) Factor de crecimiento polipeptídico que regula el desarrollo y supervivencia de las neuronas.
factor de crecimiento transformante β (TGF-β) Factor de crecimiento polipeptídico que generalmente inhibe la proliferación de las células animales.
factor de elongación Proteína implicada en la fase de elongación de la transcripción o traducción.
factor de iniciación Proteína que funciona en la etapa de iniciación de la traducción.
factor de intercambio de nucleótidos de guanina Proteína que actúa sobre pequeñas proteínas de unión a GTP para estimular el intercambio del GDP unido por GTP.
factor de liberación Proteína que reconoce a los codones de terminación y finaliza la traducción del ARNm.
factor de necrosis tumoral (TNF) Factor de crecimiento polipeptídico que induce a la inflamación celular programada.
factor de remodelación de la cromatina Proteína que desorganiza la estructura cromatínica al alterar los sitios de contacto del ADN con las histonas.
factor de respuesta al suero (SRF) Factor de transcripción que se une al elemento de respuesta al suero.
factor de transcripción Proteína que regula la actividad de la ARN polimerasa.
factor de transcripción generales Factor de transcripción que forma parte de la maquinaria general de transcripción.
factor promotor de maduración (MPF) Complejo de Cdk1 y ciclina B que promueve la entrada en la fase M, tanto de la mitosis como de la meiosis.
factor *trans*-activador Proteína reguladoras de la transcripción.
factores de remodelación del nucleosoma Proteínas que alteran la estructura de la cromatina, permitiendo a los factores de transcripción unirse al ADN nucleosomal.
$FADH_2$ Véase dinucleótido de flavina y adenina.
fagocitosis Captación de partículas grandes, como bacterias, por una célula. En ocasiones se llama «comida de las células».
fagolisosoma Lisosoma que se ha fusionado con un fagosoma o un autofagosoma.
fagosoma Vacuola que contiene una partícula internalizada por fagocitosis.
FAK (quinasa de adhesión focal) Proteína-tirosina quinasa no receptora que desempeña un papel clave en la señalización de las integrinas.
faloidina Fármaco que se fija a los filamentos de actina y previene su desensamblaje.
familia de proteínas armadillo Una familia de proteínas, incluida la β-catenina, que asocia las cadherinas con el citoesqueleto en las uniones célula-célula estables.

familia génica Grupo de genes relacionados que han surgido a partir de la duplicación de un ancestro común.
fase G_1 Fase del ciclo celular entre el final de la mitosis y el comienzo de la síntesis de ADN.
fase G_2 Fase del ciclo celular entre el final de la fase S y el comienzo de la mitosis.
fase M Fase mitótica del ciclo celular.
fase S Fase del ciclo celular durante la cual se produce la replicación del ADN.
feedforward relay Un mecanismo regulador en el que un elemento de una vía de señalización estimula a un componente corriente abajo.
fecundación Unión de un espermatozoide con un óvulo
fenotipo Apariencia física de un organismo.
fibra de estrés Haz de filamentos de actina anclado en puntos de adhesión celular a la matriz extracelular.
fibra elástica Fibra proteica que están presentes en la matriz extracelular de los tejidos conectivos en órganos que se deforman y después vuelven a su forma original.
fibra muscular Célula de gran tamaño del músculo esquelético, que se forman por la fusión de muchas células individuales durante el desarrollo.
fibrillas de colágeno Fibrilla formada por el ensamblaje de moléculas de colágeno en una organización escalonada regular.
fibroblasto Tipo de célula que se encuentra en el tejido conectivo.
fibronectina Principal proteína de adhesión de la matriz extracelular.
fijación de nitrógeno Reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a NH_3.
filamento intermedio Filamento citoesquelético de aproximadamente 10 nm de diámetro que proporciona fuerza mecánica a las células en los tejidos. Véase también queratinas y neurofilamentos.
filamina Proteína de unión a la actina que entrelaza filamentos de actina para formar redes.
filopodio Proyección delgada de la membrana plasmática soportada sobre haces de actina.
fimbrina Proteína que forma haces de actina y está implicada en la formación de las proyecciones de la superficie celular.
flagelo Proyección con base microtubular de la membrana plasmática que es responsable de movimiento celular.
flavín adenín dinucleótido ($FADH_2$) Coenzima que actúa como transportador electrónico en reacciones de oxidación/reducción.
flipasa Proteína que cataliza la traslocación de lípidos a través de la membrana del retículo endoplasmático.
flujo electrónico cíclico Ruta de transporte electrónico asociada al fotosistema I que produce ATP sin la síntesis de NADPH.
fodrina Espectrina no eritroide.
footprinting Método utilizado para identificar los sitios de unión de proteínas al ADN.
formina Una proteína de unión a la actina que nuclea y polimeriza filamentos de actina.
Fos Factor de transcripción, codificado por un protooncogén, que es inducido en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.
fosfatidilcolina Fosfolípido del glicerol con una cabeza formada a partir de la colina.
fosfatidiletanolamina Fosfolípido del glicerol cuya cabeza está formada a partir de la etanolamina.
fosfatidilinositol Fosfolípido de glicerol con un grupo cabeza formado a partir de inositol
fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) Componente fosfolipídico secundario de la cara interna de la membrana plasmática. Las hormonas y los factores de crecimiento estimulan su hidrólisis mediante la fosfolipasa C, dando lugar a segundos mensajeros como el diacilglicerol y el inositol trifosfato.
fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) Fosfolípido componente de la hoja interna de la membrana plasmática. Distintas hormonas y factores de crecimiento estimulan su hidrólisis por parte de la fosfolipasa C, produciéndose los segundos mensajeros inositol trifosfato y diacilglicerol, y su fosforilación por la PI 3-cinasa, que da lugar al segundo mensajero PIP_3.
fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) Segundo mensajero formado por la fosforilación de PIP_2.
fosfatidilserina Fosfolípido del glicerol con una cabeza formada a partir de la serina.
fosfolipasa C Enzima que hidroliza PIP_2 para formar los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato.
fosfolípido Una familia de moléculas que son los componentes principales de las membranas celulares y se componen de dos cadenas de hidrocarburo (por lo general, ácidos grados) unidos a un grupo polar que contiene un fosfato.
fosforilación Adición de un grupo fosfato a una molécula.
fosforilación oxidativa Síntesis de ATP a partir del ADP, que está acoplada a la transferencia, energéticamente favorable, de electrones a un oxígeno molecular. Éste actúa como aceptor final en una cadena de transporte electrónico.
Fotocentro Conjunto de pigmentos fotosintéticos localizado en la membrana tilacoidea de los cloroplastos.
fotorreactivación Mecanismo de reparación del ADN donde se emplea energía solar para escindir los dímeros de pirimidina.
fotorrespiración Proceso de metabolización de un derivado de la fotosíntesis.
fotosíntesis Proceso mediante el cual las células aprovechan la energía de la luz solar y sintetizan glucosa a partir de CO_2 y agua.
fotosistema I Complejo proteico de la membrana del tilacoide que emplea la energía absorbida de la luz solar para sintetizar NADPH.
fotosistema II Complejo proteico en la membrana del tilacoide que usa la energía absorbida de la luz solar para sintetizar ATP.
fragmentos de Okazaki Corto fragmento de ADN sintetizado para formar la hebra retrasada de ADN.

G_0 Estado de reposo en el que las células permanecen metabólicamente activas pero no proliferan.
gen Unidad funcional de la herencia, correspondiente a un segmento de ADN que codifica un polipéptido o una molécula de ARN.
gen de estabilidad Un gen que actúa para mantener la integridad del genoma y cuya pérdida puede dar lugar al desarrollo de un cáncer.
gen de respuesta secundaria Un gen cuya inducción después de la estimulación con factores de crecimiento de una célula requiere síntesis proteica.
gen inmediato-temprano Gen cuya transcripción es inducida rápidamente en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.
gen supresor de tumores Gen cuya inactivación conduce al desarrollo de un tumor.
genética inversa Análisis de la función génica por la introducción de mutaciones en un gen clonado.
genómica El análisis sistemático de genomas celulares completos.

genotipo Composición genética de un organismo.
giberelina Hormona vegetal.
glicerol fosfolípidos Fosfolípidos que consisten en dos ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol.
glicocálix Revestimiento carbohidratado que recubre la superficie celular.
glicolípido Lípido que consta de dos cadenas hidrocarbonadas unidas a una cabeza polar que contiene carbohidratos.
glicoproteína Proteína unida a oligosacáridos.
glicosaminoglicano (GAG) Polisacárido de la matriz extracelular, constituyente de geles.
glicosidasa Una enzima que elimina residuos de azúcar de su sustrato.
glicosilación Adición de carbohidratos a las proteínas.
glicosiltransferasa Una enzima que añade residuos de azúcar a su sustrato.
glioxisoma Peroxisoma en los que tienen lugar las reacciones del ciclo del glioxilato.
glucocorticoide Esteroide producido por la glándula adrenal que actúa para estimular la producción de glucosa.
glucógeno Polímero de restos de glucosa que es la principal fuente de almacenamiento de carbohidratos en los animales.
glucólisis Degradación anaeróbica de glucosa.
gluconeogénesis Síntesis de glucosa.
GMP cíclico (GMPc) Guanosina monofosfato donde el grupo fosfato está covalentemente unido a los átomos de carbono 3′ y 5′, formando una estructura cíclica; importante segundo mensajero en la respuesta de las células a una variedad de hormonas y en la visión.
GMPc fosfodiesterasa Enzima que degrada GMPc.
gradiente electroquímico Diferencia en la concentración química y en el potencial eléctrico a través de una membrana.
granulocito Tipo de célula sanguínea que están implicadas en reacciones inflamatorias.
grasas Véase triacilgliceroles.
grupo prostético Pequeña molécula unida a una proteína.
guanina Purina que se empareja con citosina.
guanilato ciclasa Enzima que cataliza la formación de GMP cíclico a partir de GTP.

H3 centromérica (H3Cen) Variante de la hitota H3 que está presente en los centrómeros
haces contráctiles Haz de filamentos de actina que interaccionan con la miosina II y son capaces de contracción.
haploide Organismo o célula que presenta una copia de cada cromosoma.
haz de actina Filamentos de actina que se entrecruzan en formaciones densamente empaquetadas.
hebra directora Hebra del ADN sintetizada de forma continua en la dirección de avance de la horquilla de replicación.
hebra retrasada Hebra del ADN sintetizada de forma opuesta a la dirección de avance de la horquilla de replicación, mediante la unión de los fragmentos de Okazaki.
Hedgehog Molécula secretada de señalización que estimula una vía que regula el destino celular en el transcurso del desarrollo embrionario.
helicasa Enzima que cataliza el enrollamiento del ADN.
α hélice Estructura secundaria enrollada de una cadena polipeptídica formada por uniones de hidrógeno entre aminoácidos separados por cuatro residuos.
hélice-giro-hélice Dominio de unión al ADN de un factor de transcripción en el que tres o cuatro regiones en hélice contactan con el ADN.
hélice-lazo-hélice Dominio de unión a ADN de un factor de transcripción formado por la dimerización de dos cadenas polipeptídicas. Los dominios de dimerización de estas proteínas consisten en dos regiones en hélice separadas por un lazo.
hemicelulosa Polisacárido que entrelaza microfibrillas de celulosa en las paredes celulares vegetales.
hemidesmosoma Región de contacto entre células y la matriz extracelular donde los filamentos de queratina se unen a la integrina.
hendidura revestida de clatrina Región especializada de la superficie de las membranas celulares que contiene receptores para macromoléculas que deben internalizarse por mitosis.
herencia epigenética La transmisión de información que no se encuentra en la secuencia del ADN.
herpesvirus Miembro de una familia de virus de ADN, algunos de cuyos miembros inducen cáncer.
herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi Herpesvirus humano que causa el sarcoma de Kaposi.
heterocromatina Cromatina condensada y transcripcionalmente inactiva.
hibridación de los ácidos nucleicos Formación de moléculas de doble hebra de ADN y/o ARN por apareamiento de bases complementarias.
hibridación fluorescente *in situ* (FISH) Método empleado para localizar genes en los cromosomas, empleando sondas fluorescentes.
hibridación *in situ* Uso de sondas radioactivas o fluorescentes para detectar secuencias de ARN o ADN en extractos celulares, cromosomas o células intactas.
hidrofílico Soluble en agua.
hidrofóbico No soluble en agua.
hipermutación somática La introducción de múltiples mutaciones en las regiones variables de inmunoglobulina reordenadas para incrementar la diversidad de los anticuerpos.
hipótesis SNARE Hipótesis de que la fusión vesicular está mediada por pares de proteínas transmembrana (SNARE) en las membranas vesicular y diana.
hipótesis un gen-una enzima Esta hipótesis, que se sustenta en el análisis de los mutantes nutricionales de Neurospora realizados en la década de 1940, sostiene que un gen codifica la estructura de una única enzima. En la actualidad, se cree que un gen especifica la estructura de una sola cadena polipeptídica.
histona Miembro de una familia de proteínas que empaquetan en ADN en los cromosomas de las células eucarióticas.
hoja β Estructura secundaria en forma de lámina de una cadena polipeptídica, formada por enlaces de hidrógeno entre aminoácidos localizados en diferentes regiones del polipéptido.
homeobox (caja homeótica) Secuencias de ADN conservadas de 180 pares de bases que codifican los homeodominios.
homeodominio Tipo de dominio, de unión al ADN, que se encuentra en los factores de transcripción que regulan la expresión génica durante el desarrollo embrionario.
hormona Molécula de señalización producidas por las glándulas endocrinas que actúan sobre células en lugares distantes del cuerpo.
hormona esteroidea Miembro de un grupo de hormonas hidrofóbicas, como estrógeno y testosterona, que provienen del colesterol.
hormona peptídica Molécula señalizadora compuesta por aminoácidos.
hormona tiroidea Hormona sintetizada a partir de la tirosina en la glándula tiroides.
hormonas vegetales Miembro de un grupo de pequeñas moléculas que coordinan las respuestas de los tejidos vegetales a las señales medioambientales.

horquilla de replicación Región de la síntesis del ADN donde las hebras parentales se separan y crecen dos nuevas hebras hijas.
huso mitótico Formación de microtúbulos que se extienden desde los polos del huso y que es responsable de la separación de los cromosomas hermanos durante la mitosis. Véase también microtúbulos cinetocóricos, microtúbulos polares y microtúbulos astrales.

IAP Inhibidor de la apoptosis. Miembro de una familia de proteínas que inhiben la apoptosis mediante la interacción con caspasas.
IκB Una subunidad inhibidora de los factores de transcripción NF-κB.
importina Receptor proteico que reconoce señales de localización nuclear y dirige la importación nuclear.
impronta genómica Regulación de los genes cuya expresión depende de si han sido heredados por parte de la madre o del padre, aparentemente regulada por la metilación del ADN.
inactivación del cromosoma X Mecanismo de compensación de la dosis en el que la mayoría de los genes de uno de los cromosomas X se inactivan en las células femeninas.
inestabilidad dinámica Alternación de los microtúbulos entre ciclos de crecimiento y degradación.
inhibición de contacto Inhibición del movimiento o de la proliferación de células normales como resultado de un contacto célula-célula.
inhibición dependiente de la densidad Cese de la proliferación de células normales en cultivo a una determinada densidad celular.
inhibición por retroalimentación Tipo de regulación alostérica en donde el producto de una ruta metabólica inhibe la actividad de una enzima implicada en su síntesis.
inhibidor de Cdk (CKI) Miembro de una familia de proteínas que fijan Cdk e inhiben su actividad.
iniciación tumoral Primer paso en el desarrollo de un tumor, resultante de la proliferación anormal de una sola célula.
inmunoglobulina Véase anticuerpo.
inmunoprecipitación Empleo de anticuerpos para aislar proteínas.
inmunoprecipitación de cromatina Un método para la determinación de las regiones del ADN que se unen a factores de transcripción en el interior celular.
inmunotinción Método que emplea anticuerpos para detectar proteínas que han sido separadas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.
inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) Segundo mensajero, formado por la hidrólisis de PIP_2, que señala la liberación de iones de calcio desde el retículo endoplasmático.
integrina Proteína transmembrana que interviene en la adhesión de las células a la matriz extracelular.
interacción heterofílica Interacción entre dos tipos diferentes de moléculas de adhesión celular.
interacción homofílica Interacción entre moléculas de adhesión celular del mismo tipo.
intercambio rotatorio Comportamiento dinámico de los filamentos de actina y los microtúbulos, en el que la pérdida de subunidades en un extremo del filamento se equilibra por su adición en el otro extremo.
interfase Período del ciclo celular entre dos mitosis que incluye las fases G_1, S, y G_2.
interferencia de ARN (ARNi) Degradación del ARNm por moléculas de ARN cortas, de doble hebra y homólogas.
intrón Secuencia no codificante que interrumpe los exones en un gen.

Jun Factor de transcripción, codificado por un protooncogén, que es activado en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

kilobase (kb) Mil nucleótidos o pares de bases de nucleótidos.
knockout Inactivación de un gen cromosómico mediante recombinación homóloga con un alelo mutante clonado.

lamela media Región de la pared celular vegetal que actúa como pegamento para mantener unidas las células adyacentes.
lamelipodio Amplia extensión de la membrana plasmática, formada a partir de actina, que está implicada en el movimiento de los fibroblastos.
lámina Proteína de los filamentos intermedios que forman la lámina nuclear.
lámina basal Matriz extracelular en forma de lámina que soporta las células epiteliales y rodea las células musculares, células adiposas y nervios periféricos.
lámina nuclear Malla de filamentos laminares que proporciona un soporte estructural al núcleo.
laminina Principal proteína de adhesión de la lámina basal.
lazo de retroalimentación Un mecanismo de regulación en el que un elemento corriente abajo de una vía de señalización controla la actividad de un componente corriente arriba de la misma vía.
leptoteno Estadio inicial de la larga profase de la meiosis I durante la cual los cromosomas homólogos se emparejan después de la condensación.
leucemia Cáncer que aparece en los precursores de las células sanguíneas circulantes.
leucoplasto Plástido que almacena fuentes de energía en tejidos vegetales no fotosintéticos.
levaduras Los eucariotas unicelulares más simples. Las levaduras son modelos importantes para los estudios de las células eucariotas.
ligando Molécula que se une a un receptor.
lignina Polímero de restos fenólicos que fortalece las paredes celulares secundarias.
linaje celular Células que pueden proliferar indefinidamente en cultivo.
LINE (long interspersed elements) Familia de retrotransposones altamente repetidos en el genoma de los mamíferos.
linfocito Célula sanguínea que actúa en la respuesta inmunitaria. Los linfocitos B producen anticuerpos y los linfocitos T son responsables de la inmunidad mediada por células.
linfoma Cáncer de células linfoides.
lípido Miembro de un grupo de moléculas hidrofóbicas que funciona como depósito de energía, como señalización molecular y como componente principal de la membrana celular.
lipoproteína de baja densidad (LDL) Partícula de lipoproteína que transporta colesterol en la circulación.
liposoma Vesícula lipídica empleada para introducir ADN en las células de mamífero.
lisosoma Orgánulo citoplasmático que contiene enzimas que destruyen polímeros biológicos.

macrófago Clase de glóbulo blanco sanguíneo especializado en la fagocitosis.
macropinocitosis Ingesta de fluidos en grandes vesículas.
manosa-6-fosfato Residuo modificado de manosa que dirige las proteínas hacia los lisosomas.
MAP quinasas Familia de proteína-serina/treonina quinasas activadas por mitógeno que son reguladores ubicuos del crecimiento y diferenciación celular.

mapa de restricción Localización de los sitios de corte de la endonucleasa de restricción en una molécula de ADN.
marco de lectura abierto Secuencia de nucleótidos que no contiene codones de detención y puede codificar un polipéptido.
material pericentriolar Material en el centrosoma que inicia el ensamblaje de los microtúbulos.
matriz Espacio interno mitocondrial.
matriz extracelular Proteínas y polisacáridos secretados que rellenan los espacios entre las células y que une las células y los tejidos entre sí.
mediador Complejo de proteínas que estimula la transcripción de los genes codificadores de proteínas y les permite responder a los factores reguladores gen-específicos.
megabase (Mb) Un millón de nucleótidos o de pares de bases de nucleótidos.
meiosis División de células diploides en una progenie haploide, consistente en dos rondas secuenciales de división nuclear y celular.
MEK (MAP quinasa/ERK quinasa) Proteína de especificidad dual que fosforila y activa a miembros de la familia ERK de MAP quinasas.
membrana de basamento Véase lámina basal.
membrana nuclear Una de las membranas que forma la envuelta nuclear; la membrana nuclear externa continúa por el retículo endoplasmático y la membrana nuclear interna es adyacente a la lámina nuclear.
membrana plasmática Bicapa fosfolipídica con proteínas asociadas que rodea la célula.
membrana del tilacoide Membrana más interna de los cloroplastos y que es el sitio donde tiene lugar el transporte electrónico y la síntesis de ATP.
mesodermo Capa media germinal; da lugar a los tejidos conectivos y al sistema hematopoyético.
metabolismo oxidativo Empleo del oxígeno molecular como aceptor de electrones en la degradación de moléculas orgánicas.
metafase Fase de la mitosis durante la cual los cromosomas se alinean en la placa metafásica en el centro de la célula.
metástasis Propagación de las células cancerígenas desde la sangre o el sistema linfático a otros lugares del organismo.
microARN (miARN) Un ARN corto no codificante que se produce de forma natural y actúa para regular la expresión génica.
***microarray* de ADN** Portaobjetos de cristal o un filtro sobre el que se imprimen oligonucleótidos o fragmentos de ADNc con una elevada densidad, permitiendo el análisis simultáneo de miles de genes mediante hibridación del *microarray* con sondas fluorescentes.
microfibrillas de celulosa Fibra de las paredes celulares vegetales que se forman por la asociación de varias docenas de cadenas paralelas de celulosa.
microfilamento Filamento citoesquelético compuesto de actina.
microscopia confocal Forma de microscopia en la que se combina la microscopia de fluorescencia con el análisis electrónico de la imagen para obtener imágenes con un contraste y detalle elevados.
microscopia de campo claro Forma más sencilla de microscopia lumínica, en la que la luz pasa directamente a través de una célula.
microscopia de contraste de fases Tipo de microscopia en el que las variaciones en la densidad o el grosor entre partes de la célula se convierten en diferencias de contraste en la imagen final.
microscopia de contraste por interferencia diferencial Tipo de microscopia en el que las variaciones de la densidad o el grosor entre partes de la célula se convierten en diferencias de contraste en la imagen final.
microscopia de excitación multifotónica Forma de microscopia de fluorescencia en la que la muestra es iluminada con una luz de longitud de onda tal que la excitación del colorante fluorescente requiere de la absorción simultánea de dos o más fotones.
microscopia de fluorescencia Tipo de microscopia en el que las moléculas son detectadas en base a la emisión de luz fluorescente.
microscopia electrónica Tipo de microscopia que emplea un rayo de electrones para formar una imagen. En la microscopia electrónica de transmisión, un rayo de electrones pasa a través de una muestra marcada con metales pesados. En la microscopia electrónica de barrido, los electrones dispersados por la superficie de la muestra se analizan para generar una imagen tridimensional.
microscopia electrónica de barrido Véase microscropia electrónica.
microscopia electrónica de transmisión Véase microscopia electrónica.
microscopia favorecida por vídeo Uso combinado de cámaras de vídeo con microscopia lumínica para permitir la visualización de objetos pequeños.
micropúa Véase filopodio.
microsoma Pequeña vesícula formada por el retículo endoplásmico cuando las células se rompen.
microtúbulo Componente citoesquelético formado por la polimerización de la tubulina dando lugar a segmentos rígidos y huecos de aproximadamente 25 nm de diámetro.
microtúbulo astral Microtúbulo del huso mitótico que se extienden a la periferia celular.
microtúbulo cinetocórico Microtúbulo del huso mitótico que fijan los cromosomas condensados a sus centrómeros.
microtúbulo polar Un miembro de una clase de microtúbulos del huso mitótico que se solapan en el centro de la célula y que empujan a los polos del huso para separarlos.
microtúbulos cromosómicos Los microtúbulos del huso mitótico que se unen a los extremos de los cromosomas condensados.
microvellosidad Extensión de la membrana plasmática, basada en la actina, abundante en las superficies de las células implicadas en la absorción.
mineralocorticoides Hormona esteroidea producidas por la glándula adrenal que actúan sobre el riñón para regular el equilibrio de sales y agua.
miofibrilla Haz de filamentos de actina y miosina en las células musculares.
miosina Proteína que interacciona con la actina como motor molecular.
miosina I Tipo de miosina que actúa para transportar mercancías a lo largo de los filamentos de actina.
miosina II Tipo de miosina que produce la contracción mediante el deslizamiento de filamentos de actina.
miosina no convencional Tipo de miosina distinto del presente en las células musculares (miosina II).
mitocondria Orgánulo citoplasmático responsable de la síntesis de la mayoría del ATP de las células eucariotas mediante fosforilación oxidativa.
mitosis División nuclear. El estadio más espectacular del ciclo celular, correspondiente a la separación de los cromosomas hijos y que habitualmente termina con la división celular (citocinesis).
modelo de cerradura y llave Modelo de acción enzimática en el que el sustrato encaja con precisión en el centro activo de la enzima.

modelo de mosaico fluido Modelo de estructura de la membrana donde las proteínas se insertan en una bicapa fluida fosfolipídica.
modelo del filamento deslizante Modelo de contracción muscular en el que la contracción resulta del deslizamiento de los filamentos de actina y miosina, uno respecto del otro.
modelo Holliday Un modelo molecular de recombinación genética que implica la formación de regiones heterodúplex.
moléculas de adhesión celular Proteínas transmembrana que intervienen en las interacciones célula-célula.
molécula recombinante Fragmento de ADN unido a un vector.
monocistrónico ARN mensajero que codifica una única cadena polipeptídica.
monolito Tipo de célula sanguínea implicada en las reacciones inflamatorias.
monosacáridos Azúcar sencillo con la fórmula básica de $(CH_2O)_n$.
Mos Proteína quinasa necesaria para la progresión desde la meiosis I hasta la meiosis II y el mantenimiento de la detención en metafase II en los oocitos de vertebrados.
motor molecular Proteína que genera fuerza y movimiento mediante la conversión de energía química en energía mecánica.
mTOR Proteína-cinasa implicada en la regulación de la síntesis proteica y la autofagia en respuesta a la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes, y energía.
muerte celular programada Forma fisiológica normal de muerte celular caracterizada por la apoptosis.
mundo ARN Estadio temprano de la evolución basado en moléculas autorreplicantes de ARN.
mutación Alteración genética.
mutagénesis *in vitro* Introducción de mutaciones en un ADN clonado *in vitro*.
mutágeno Producto químico que induce una alta frecuencia de mutaciones.
mutante inhibidor dominante Mutante que interfiere con la función del alelo normal del gen.
mutante sensible a temperatura Célula que expresa una proteína que es funcional a una temperatura pero no a otra, mientras que la proteína normal es funcional a ambas temperaturas.

NAD^+ Véase dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADP reductasa Enzima que transfiere electrones de la ferrodoxina al $NADP^+$, dando NADPH.
nebulina Proteína que regula la longitud de los filamentos de actina en las células musculares.
necroptosis Forma de muerte celular necrótica inducida en forma de respuesta programada ante estímulos tales como infecciones o daño del ADN.
necrosis Muerte accidental de células que da lugar a una lesión aguda.
nectina Una molécula de adhesión celular implicada en la formación de uniones adherentes.
neurofilamento Clase de filamento intermedio que sostiene los axones de las células nerviosas.
neurohormona Péptidos que son secretados por las neuronas y que actúan sobre células distantes.
neurona Célula nerviosa especializada en recibir y transmitir señales por todo el cuerpo.
neuropéptido Molécula peptídica de señalización secretada por las neuronas.
neurotransmisor Pequeña molécula hidrofílica que transporta una señal desde una neurona estimulada a una célula diana en una sinapsis.
neurotrofina Miembro de una familia de polipéptidos que regula el desarrollo y supervivencia neuronal.
nexina Proteína que une dobletes de microtúbulos entre sí en el axonema.
NF-κB Una familia de factores de transcripción que se activan en respuesta a una diversidad de estímulos.
nicho Microambiente que mantiene a las células madre en los tejidos.
nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD^+) Coenzima que actúa como transportador electrónico en reacciones de oxidación/reducción.
nidogén Véase entactina.
nidógeno Proteína de la matriz extracelular que interacciona con las lamininas y el colágeno tipo IV en las láminas basales.
N-miristoilación Adición de ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) al resto de glicina N-terminal de una cadena polipeptídica.
N-*myc* Protooncogén que codifica un factor de transcripción y es activado con frecuencia por la amplificación de neuroblastomas.
nitrosilación La modificación proteica mediante la adición de grupos NO a las cadenas laterales de los residuos de cisteína.
Notch Receptor transmembrana de una vía de señalización que regula el destino celular como consecuencia de interacciones intercelulares durante el desarrollo.
núcleo Orgánulo más prominente de las células eucariotas; contiene el material genético.
nucléolo Sitio nuclear de transcripción y procesamiento del ARNr, y ensamblaje de los ribosomas.
nucleósido Base de purina o pirimidina unida a un azúcar (ribosa o desoxirribosa).
nucleosoma Unidad básica estructural de cromatina que consiste en ADN enrollado alrededor de un núcleo de histona.
nucleótido Nucleósido fosforilado.

oligonucleótido Polímero corto de sólo unos pocos nucleótidos.
oligosacárido Polímero corto de sólo unos pocos azúcares.
oncogén Gen capaz de inducir una o más características de las células cancerígenas.
operador Secuencia reguladora de ADN que controla la transcripción de un operón.
operón Grupo de genes adyacentes transcritos como un único ARNm.
organizador celular activado por fluorescencia Instrumento que organiza las células individuales en base a su intensidad de fluorescencia.
origen de replicación Secuencia específica de ADN que actúa como sitio de unión para las proteínas que inician la replicación.

p53 Factor de transcripción (codificado por el gen supresor de tumores p53) que detiene el ciclo celular en G_1 en respuesta a un ADN dañado y que se requiere para la apoptosis inducida por diferentes estímulos.
palmitoilación Adición de ácido palmítico (un ácido graso de 16 carbonos) a restos de cisteína de una cadena polipeptídica.
papilomavirus Miembro de la familia de virus de ADN, algunos de los cuales causan cáncer cervical y otros cánceres anogenitales en el hombre.
paquiteno Estadio de meiosis I durante el cual tiene lugar la recombinación entre los cromosomas homólogos.
pared celular Estructura rígida y porosa que forma una capa externa y proporciona soporte estructural a bacterias, hongos y células vegetales.

pared celular secundaria Pared celular gruesa que se encuentra entre la membrana plasmática y la pared celular primaria de las células vegetales que han cesado su crecimiento.
paredes celulares primarias Paredes de células vegetales en crecimiento.
partícula de reconocimiento de la señal (SRP) Partícula compuesta de proteínas y de ARN 7SL que se une a las secuencias de señalización y dirige las cadenas polipeptídicas al retículo endoplásmico.
partículas de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPsn) Complejo de ARNsn con proteínas.
partículas del centro del nucleosoma Partículas que contienen 146 pares de bases de ADN asociados en torno a un núcleo de histonas.
peptidasa de señalización Enzima que retira la secuencia de señalización de una cadena polipeptídica por proteólisis.
peptidasa procesadora de la matriz (MPP) Proteasa que escinde presecuencias de las proteínas internalizadas en la matriz mitocondrial.
peptidasa procesadora estromal (SPP) Proteasa que escinde a los péptidos de tránsito de las proteínas internalizadas en el estroma del cloroplasto.
péptido de transición Secuencia N-terminal que dirigen a las proteínas para su internalización en el cloroplasto.
pectina Polisacárido formador de geles de las paredes celulares vegetales.
peptidil prolil isomerasa Enzima que facilita el pliegue de las proteínas mediante la catalización de la isomerización *cis-trans* de los enlaces prolil peptídicos.
peptidoglicano Componente principal de las paredes celulares bacterianas constituido por cadenas polisacáridas lineales entrelazadas mediante péptidos cortos.
peroxina Una proteína presente en los peroxisomas.
peroxisoma Orgánulo citoplasmático especializado en llevar a cabo reacciones oxidativas.
pez cebra Especie de pez pequeño empleado para estudios genéticos del desarrollo de los vertebrados.
PI 3-cinasa Véase fosfatidilinositol (PI) 3-cinasa.
pigmento fotosintético Molécula que capturan la energía de los rayos solares absorbiendo fotones.
pinocitosis Captación de líquidos o moléculas al interior de una célula en vesículas pequeñas; a veces se le denomina «bebida de las células»
pirimidina Uno de los tipos de bases presentes en los ácidos nucleicos. Las pirimidinas son citosina, timidina y uracilo.
placa celular Estructura discoide rodeada por membrana que forma nuevas paredes celulares durante la citocinesis de las plantas superiores.
plaquina Miembro de una familia de proteínas que asocia los filamentos intermedios con otras estructuras celulares.
plasmalógenos Familia de fosfolípidos que tienen enlace éter y enlace éster.
plásmido Molécula pequeña de ADN circular capaz de replicarse de forma independiente en una célula hospedadora.
plásmido Ti Plásmido empleado para la transferencia génica en plantas.
plasmodesmo Conexión citoplasmática entre células vegetales adyacentes que está formada por una región continua de membrana plasmática.
plastos Miembro de una familia de orgánulos vegetales que incluye a los cloroplastos, cromoplastos, leucoplastos, amiloplastos y elaioplastos.
PML/RARα Oncogén formado por la translocación del receptor del ácido retinoico en la leucemia aguda promielocítica.
poliadenilación proceso de adición de una cola de poli-A a un pre-ARNm.
policistrónico ARN mensajero que codifica múltiples cadenas polipeptídicas.
polinucleótido Polímero que contiene millones de nucleótidos.
poliomavirus Virus de ADN tumoral ampliamente estudiado.
poliomavirus de las células de Merkel Papilomavirus causante de un cáncer de piel infrecuente (carcinoma de células de Merkel) en humanos.
polipéptido Polímero de aminoácidos.
pólipo Tumor benigno que se extiende por una superficie epitelial.
polisacárido Polímero que contiene cientos o miles de azúcares.
polisoma Serie de ribosomas que traducen un ARN mensajero.
porina Miembro de una clase de proteínas que atraviesan las membranas como barriles-β y forman canales en las membranas externas de algunas bacterias, mitocondrias y cloroplastos.
potenciador (Referido a «enhancer», «secuencia activadora» o «secuencia intensificadora».) Secuencia reguladora de la transcripción que puede localizarse en un sitio distante del promotor.
potencial de acción Impulsos nerviosos que viajan a lo largo de los axones.
pre-ARNm Transcritos primarios que se procesan para formar ARN mensajeros en las células eucariotas.
pre-ARNr Transcritos primarios que se cortan para dar lugar a ARN ribosómicos individuales (los ARNr 28S, 18S y 5,8S de las células eucariotas).
pre-ARNt Transcritos primarios que se cortan para formar ARN de transferencia.
prenilación Adición de tipos específicos de lípidos (grupos prenilo) a restos de cisteína C-terminales de una cadena polipeptídica.
presión de turgencia Presión interna hidrostática en el interior de las células vegetales.
presecuencia Secuencia aminoterminal que dirige las proteínas hacia las mitocondrias.
primasa ARN polimerasa usada para iniciar la síntesis de ADN.
procolágeno Precursor soluble de los colágenos formadores de fibrillas.
producto Compuesto formado como resultado de una reacción enzimática.
profase Fase inicial de la mitosis, marcada por la aparición de los cromosomas condensados y el desarrollo del huso mitótico.
profilina Proteína de unión a la actina que estimula el ensamblaje de monómeros de actina en filamentos.
progesterona Hormona esteroidea producida por los ovarios.
progresión tumoral Acumulación de mutaciones en el interior de células de una población tumoral, resultando en un crecimiento acelerado y malignidad.
prometafase Período de transición entre la profase y la metafase durante la cual los microtúbulos del huso mitótico se unen a los cinetocoros y los cromosomas se mueven de un lado a otro hasta que son alineados en el centro de la célula.
promotor Secuencia de ADN donde se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.
promotor tumoral Compuesto que conduce al desarrollo tumoral mediante la estimulación de la proliferación celular.
pronúcleo Uno de los dos núcleos haploides de un ovocito recién fecundado.
proplástido Orgánulo no diferenciado de pequeño tamaño que puede transformarse en distintos tipos de plástidos maduros.

prostaciclina Eicosanoide formado a partir de la prostaglandina H_2.
prostaglandina Familia de lípidos eicosanoides implicados en la señalización de la inflamación.
proteína Polipéptido con una secuencia aminoacídica exclusiva.
proteína activadora de la GTPasa Proteína que estimula la hidrólisis de GTP por parte de las proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP.
proteína asociadas a los microtúbulos (MAP) Proteína que se une a los microtúbulos y modifica su estabilidad.
proteína de fijación a TATA (TBP) Factor de transcripción basal que se une de forma directa a la caja TATA.
proteína de fluorescencia verde (GFP) Proteína de medusa que se emplea comúnmente como marcador en la microscopia de fluorescencia.
proteína de transferencia de fosfolípidos Proteína que transporta moléculas fosfolipídicas entre membranas celulares.
proteína de unión a la actina Proteína que se entrecruza a la actina y regula el ensamblaje, desensamblaje y organización de filamentos de actina.
proteína de unión al ADN de hebra sencilla Proteína que estabiliza el ADN desenrollado uniéndose a las regiones de hebra sencilla.
proteína disulfuro isomerasa Enzima que cataliza la formación y rotura de los puentes disulfuro (S-S).
proteína fosfatasa Enzima que revierte la acción de las proteínas quinasas mediante la retirada de los grupos fosfatos desde restos de aminoácidos fosforilados.
proteína-G Familia de proteínas de señalización celular reguladas por la unión del nucleótido guanina.
proteína G heterotrimérica Proteína de unión a nucleótidos de guanina que consiste en tres subunidades.
proteína HMG Miembro de una familia de proteínas cromosómicas no histónicas que influye en la arquitectura de la cromatina.
proteína integral de membrana Proteína embebida en el interior de la bicapa lipídica de las membranas celulares.
proteína periférica de membrana Proteína indirectamente asociada con las membranas celulares mediante interacciones proteína-proteína.
proteína quinasa Enzima que fosforila proteínas mediante la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP.
proteína quinasa A Proteína quinasa regulada por el AMP cíclico.
proteína quinasa AMPc-dependiente Véase proteína quinasa A.
proteína quinasa C miembro de una familia de proteína-serina/treonina quinasas que se activan con diacilglicerol y Ca^{2+} y actúan en la transducción intracelular de señales.
proteína *scaffold* Proteína que se unen a componentes de las vías de señalización, dando lugar a su organización en complejos señalizadores específicos.
proteína-serina/treonina quinasa Proteína quinasa que fosforila restos de serina y treonina.
proteína STAT Miembro de una familia de factores de transcripción que tienen un dominio SH2 y que son activadas por la fosforilación de la tirosina, que promueve su translocación desde el citoplasma al núcleo.
proteína-tirosina fosfatasa Enzima que retira los grupos fosfato desde restos de fosfotirosina.
proteína-tirosina quinasa Proteína quinasa que fosforila restos de tirosina.
proteína-tirosina quinasa no receptora Proteína tirosina quinasa intracelular.
Proteína tirosina quinasa transmembrana Proteína-tirosina quinasa asociada a la membrana que es receptora de ligandos extracelulares.
proteína transmembrana Proteína integrales de membrana que se extienden por la bicapa lipídica y que presentan porciones expuestas a ambos lados de la membrana.
proteína transportadora Proteína que se une selectivamente fijan y transportan pequeñas moléculas a través de una membrana.
proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP Gran familia de proteínas monoméricas de unión a GTP, incluyendo las proteínas Ras, Rab, Rho y Ran.
proteínas de canal Proteína que forman poros a través de una membrana.
proteínas de choque térmico Miembro altamente conservado de proteínas chaperona que se expresan en células expuestas a elevadas temperaturas o a otras formas de estrés medioambiental.
proteínas del neurofilamento (NF) Miembro de una familia de proteínas de los filamentos intermedios de diversos tipos de células nerviosas maduras.
proteínas ERM Familia de proteínas (ezrina, radixina y moesina) que unen los filamentos de actina a la membrana plasmática en muchos tipos de células.
proteínas HMGN Proteínas no histónicas cromosómicas asociadas con la cromatina descondensada, transcripcionalmente activa.
proteoglicano Proteína que se une a los glicosaminoglicanos.
proteoma Todas las proteínas expresadas en una célula determinada.
proteómica Análisis a gran escala de las proteínas celulares.
proteosoma Gran complejo constituido por proteasas que degrada las proteínas marcadas por la ubiquitina.
proto-oncogén Gen celular normal que puede convertirse en un oncogén.
prueba de asociación de todo el genoma Método de análisis genómico a gran escala empleado para identificar genes responsables de trastornos hereditarios.
pseudogén Copia no funcional de un gen.
pseudogén procesado Pseudogén que surge de la transcripción inversa de ARNm.
pseudopodio Extensión de la membrana plasmática, constituida por actina, responsable de la fagocitosis y del movimiento ameboide.
PTEN Fosfatasa lipídica que defosforila PIP_3 y actúa como supresor de tumores.
Punto de control de daños al ADN Punto de control del ciclo celular que garantiza que el ADN dañado no se replicará ni se transmitirá a las células hijas.
Punto de control de ensamblaje de huso Un punto de control del ciclo celular que monitoriza el alineamiento de los cromosomas sobre el huso metafásico.
punto de restricción Punto de regulación en ciclo de las células animales que sucede tardíamente en G_1. Después de este punto, la célula está destinada a entrar en S y a sufrir un ciclo de división celular.
puntos de control del ciclo celular Punto regulador que impiden la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente se hayan completado.
purina Uno de los tipos de bases presentes en los ácidos nucleicos. Las purinas son adenina y guanina.

queratina Proteína de los filamentos intermedios de las células epiteliales.
queratina blanda Queratina encontradas en el citoplasma de las células epiteliales.
queratina dura Queratina empleada para la producción de estructuras como el pelo, uñas y cuernos.

quiasmas Lugares de recombinación que unen los cromosomas homólogos durante la meiosis.
quinasa de la cadena ligera de miosina Proteína quinasa que activa a la miosina II fosforilando su cadena ligera reguladora.
quinasa de (CHK1 y CHK2) Una proteína quinasa que orquesta la detención del ciclo celular en respuesta al ADN lesionado. CHK1 y CHK2 son activadas mediante las proteínas quinasas ATM y ATR.
quinasa Janus Familia de proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas a los receptores de citoquinas.
quinasa semejante a Polo Una proteína quinasa implicada en la formación del huso mitótico, la función cinetocórica y la citocinesis.
quinesina Proteína motora que migra a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo positivo.
quitina Polímero de restos de N-acetilglucosamina que es el principal componente de las paredes celulares fúngicas.

Rab Familia de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP que juegan papeles clave en el transporte vesicular.
Rac Proteína de bajo peso molecular de unión a GTP implicada en la regulación del citoesqueleto de actina.
Rad51 Homólogo de RecA en eucariotas.
raf Gen que codifica las proteínas Raf.
Ran Pequeña proteína de unión a GTP implicada en la importación y exportación nuclear.
ras. Gen que codifica las proteínas Ras.
ratón transgénico Ratón que porta genes no propios incorporados a su línea germinal.
Rb Proteína reguladora de la transcripción codificada por un gen supresor de tumores que fue identificada a través del análisis genético de un retinoblastoma.
RE de transición Región del RE del que salen las proteínas hacia el aparato de Golgi.
RE liso Región del retículo endoplásmico que constituye el lugar principal de la síntesis de lípidos en las células eucariotas.
RE rugoso Región del retículo endoplásmico recubierta de ribosomas que participa en el metabolismo de las proteínas.
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Método para la amplificación de una región de ADN mediante repetidos ciclos de síntesis de ADN *in vitro*.
reacciones lumínicas Reacciones de la fotosíntesis en las que la energía solar dirige la síntesis de ATP y NADPH.
reacciones oscuras Serie de reacciones que convierte el dióxido de carbono y el agua en hidratos de carbono durante la fotosíntesis. Véase ciclo de Calvin.
RecA Proteína que estimula el intercambio de hebras entre moléculas homólogas de ADN durante la recombinación.
receptor acoplado a proteína-G Receptor caracterizado por siete α-hélices acopladas a la membrana. La unión del ligando provoca un cambio conformacional que activa una proteína-G.
receptor de célula T Proteína de superficie de un linfocito T que reconoce antígenos expresados en la superficie de otras células.
receptor de hormonas esteroideas Factor de transcripción que regula la expresión génica en respuesta a las hormonas esteroideas.
receptor de rianodina Tipo de canal de calcio en el músculo y células nerviosas que se abren en respuesta a cambios en el potencial de membrana.
receptor SRP Proteína de la membrana del retículo endoplásmico que une la partícula de reconocimiento de la señal (SRP).
receptor de transporte nuclear Una proteína que reconoce las señales de localización nuclear y media el transporte a través de la envuelta nuclear.
Receptor tipo toll Miembro de una familia de receptores que reconoce diversas moléculas asociadas a bacterias y virus patógenos.
recesivo Alelo enmascarado por un alelo dominante.
recombinación Intercambio de material genético.
recombinación de cambio de clase Un tipo de recombinación específica de región responsable de la asociación de regiones de inmunoglobulina V(D)J reordenadas con diferentes regiones pesadas constantes.
recombinación específica de sitio Recombinación mediada por proteínas que reconocen secuencias específicas de ADN.
recombinación homóloga Recombinación entre segmentos de ADN con secuencias nucleotídicas homólogas.
recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado (FRAP) Un método empleado para estudiar el movimiento de proteínas en el interior de células vivas.
red de actina Filamentos de actina que se entrecruzan en redes tridimensionales no densas.
red de señalización La red interconectada formada mediante interacciones de múltiples vías de señalización en el interior de una célula.
red del *cis* Golgi Región del aparato de Golgi en el que las proteínas entran desde el retículo endoplásmico.
red del *trans* Golgi Compartimento del Golgi en el que se organizan las proteínas y se empaquetan para salir del aparato de Golgi.
región no traducida 3′ Región no codificante en el extremo 3′ del ARNm.
región no traducida 5′ Región no codificante en el extremo 5′ del ARNm.
regulación alostérica Regulación de enzimas mediante moléculas pequeñas que se fijan a sitios diferentes del centro activo, cambiando la conformación y la actividad catalítica de la enzima.
regulación por disminución de receptores Pérdida de receptores de la superficie celular como resultado de su internalización por endocitosis después de la unión del ligando.
relaciones cruzadas Un mecanismo regulador en el que una vía de señalización controla la actividad de otra.
reparación acoplada a la transcripción Reparación preferente de daño en las hebras transcritas de ADN.
reparación de bases mal apareadas Sistema de reparación que retira las bases mal emparejadas de las nuevas hebras de ADN sintetizado.
reparación por escisión de base Mecanismo de reparación del ADN en el que una única base dañada es retirada de la molécula de ADN.
reparación por escisión de nucleótido Mecanismo de reparación del ADN donde los oligonucleótidos que contienen bases dañadas se retiran de la molécula del ADN.
reparación propensa al error Forma de reparación en la que las ADN polimerasas especializadas replican a través de un sitio de ADN dañado.
reparación recombinatoria Reparación del ADN dañado mediante la recombinación con una molécula homóloga de ADN intacta.
repetición terminal larga (LTR) Secuencias de ADN encontradas en los extremos del ADN retroviral y de retrotransposones que son repeticiones directas de varios cientos de nucleótidos y se deben a la actividad de la transcriptasa inversa.
repeticiones de secuencia sencilla Miembro de una clase de secuencias repetidas de ADN que consisten en organizaciones en tandem de miles de copias de secuencias cortas.
replicación semiconservativa Proceso de replicación del ADN en el que dos hebras parentales se separan y sirven como moldes para la síntesis de nuevas hebras progenie.

represor Molécula reguladora que bloquea la transcripción.
resolución Capacidad de un microscopio de distinguir objetos separados por pequeñas distancias.
respuesta a proteínas no plegadas Una respuesta de estrés celular en el que un exceso de proteínas no plegadas en el retículo endoplásmico desencadena la inhibición general de la síntesis proteica, la expresión incrementada de chaperonas, y un incremento de la actividad del proteasoma.
retículo endoplasmático (ER) Red extensa de túbulos y sacos rodeados de membrana, implicados en la clasificación y en el procesamiento de las proteínas así como en la síntesis lipídica.
retículo endoplasmático liso Sitio principal de síntesis lipídica en las células eucariotas.
retículo endoplasmático rugoso Región del retículo endoplasmático cubierta de ribosomas e implicada en el metabolismo proteico.
retículo sarcoplásmico Red especializada de membranas de las células musculares que almacena una alta concentración de Ca^{2+}.
retinoide Molécula relacionada con el ácido retinoico.
retroposón Elemento transponible que se desplaza mediante la transcripción inversa de un intermediario de ARN.
retrotransposición Movimiento de un elemento transponible mediante la transcripción inversa de un ARN intermediario.
retrovirus Virus que se replica haciendo una copia de ADN de su genoma de ARN mediante transcripción inversa.
Rho Familia de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP implicadas en la regulación del citoesqueleto.
ribosa Azúcar de cinco átomos de carbono presente en el ARN.
ribosoma Partícula que se compone por ARN y proteínas y que son los sitios de síntesis proteica.
ribozima Enzima ARN.
RNasa H Enzima que degrada la hebra de ARN de las moléculas híbridas ARN-ADN.
RNasa P Ribozima que corta el extremo 5′ de un pre-ARNt.
rodopsina Fotorreceptor acoplado a proteína G en los bastones de la retina que activa la transducina en respuesta a la absorción lumínica.
rotura de doble hebra Daño que produce roturas en ambas hebras complementarias del ADN.

Saccharomyces cerevisiae Levadura que se reproduce por gemación frecuentemente estudiada.
sarcoma Cáncer de células de tejido conectivo.
sarcómero Unidad contráctil de las células musculares constituido por filamentos de actina y miosina que interaccionan entre sí.
secuencia de señalización Secuencia hidrofóbica en el extremo amino de una cadena polipeptídica que la marca en las bacterias para ser secretada o, en las células eucariotas, para que se incorpore al retículo endoplasmático.
secuencia espaciadora Secuencia de ADN presentes entre los genes.
secuencia replicante de forma autónoma (ARS) Origen de replicación de ADN en levaduras.
secuencia Shine-Dalgarno Secuencia anterior al sitio de iniciación que alinea los ARN bacterianos de forma correcta en los ribosomas.
secuenciación de la siguiente generación Nuevos métodos que permiten secuenciar rápidamente miles de millones de bases del ADN.
segundo mensajero Compuesto cuyo metabolismo se ve modificado como resultado de una interacción ligando-receptor; actúa como un transductor de señal regulando otros procesos intracelulares.
selección clonal Proceso por el que evolucionan los nuevos clones de células tumorales sobre la base de una mayor tasa de crecimiento o bien otras propiedades (como supervivencia, invasión o metástasis) que les confieren una ventaja selectiva.
selectinas Tipo de células de adhesión celular que reconocen oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula.
señal de exportación nuclear Secuencia aminoacídica que marca las proteínas para transportarlas desde el núcleo al citosol.
señal de localización nuclear Secuencia aminoacídica que marca las proteínas para transportarlas desde el citoplasma al núcleo.
señalización autocrina Tipo de señalización celular en la que una célula produce un factor de crecimiento al cual también ella responde.
señalización endocrina Tipo de señalización célula-célula donde células endocrinas segregan hormonas que son llevadas por la circulación a células diana lejanas.
señalización paracrina Señalización célula-célula local donde una molécula liberada por una célula actúa sobre la célula diana vecina.
simporte Transporte de dos moléculas en la misma dirección a través de una membrana.
sinapsis Unión entre una neurona y otra célula, a través de la cual se transmite la información mediante neurotransmisores. Asociación de cromosomas homólogos durante la meiosis.
sinapsis eléctrica Ensamblaje especializado de uniones de tipo *gap* que permiten el paso rápido de iones entre células nerviosas.
SINE (*short interspersed elements*) Miembro de una familia de retrotransposones altamente repetidos en los genomas de los mamíferos.
síntesis de ADN translesión Una forma de reparación en los que ADN polimerasas especializadas replican a través de un sitio lesionado del ADN.
Smad Una familia de factores de transcripción activada mediante receptores de TGF-β.
SNARE Proteína transmembrana que interviene en la fusión de vesículas con las membranas diana.
sombreado metálico Técnica de microscopia electrónica en la que la superficie de una muestra se cubre con una fina capa de metal evaporado.
***splicing* alternativo** Generación de diferentes ARNm mediante variación del modelo de *splicing* del pre-ARNm.
***splicing* de ARN** Unión de exones en una molécula precursora de ARN.
src Gen que codifica la proteína Src.
Src Proteína-tirosina quinasa no receptora codificada por el oncogén (*src*) del virus del sarcoma de Rous.
START Punto regulador en el ciclo celular de levaduras que sucede al final de G_1. Después de este punto, la célula está determinada a entrar en S y sufrir un ciclo de división celular.
SUMO Modificador pequeño relacionado con la ubicuitina. Proteína tipo ubicuitina que sirve de marcador para la localización de proteínas y regula la actividad de estas.
superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) Familia de moléculas de adhesión celular que contiene dominios estructurales similares a las inmunoglobulinas.
superfamilia de los receptores de citoquinas Familia de receptores de la superficie celular que actúan estimulando la actividad de proteína quinasas intracelulares.

superfamilia de los receptores nucleares Familia de factores de transcripción que incluye a los receptores de hormonas esteroídicas, la hormona tiroidea, el ácido retinoico y la vitamina D_3.
sustrato Molécula sobre la que actúa una enzima.

talina Proteína que media la asociación de filamentos de actina con integrinas en las adhesiones focales.
taxol Fármaco que se une a los microtúbulos y los estabiliza.
técnica *patch clamp* Método empleado para aislar y estudiar la actividad de canales iónicos aislados.
telofase Fase final de la mitosis, en la que se vuelve a formar el núcleo y se descondensan los cromosomas.
telomerasa Transcriptasa inversa que sintetiza secuencias repetidas teloméricas en los extremos de los cromosomas a partir de su propio molde de ARN.
telómero Repetición de secuencias sencillas de ADN que mantienen los extremos de los cromosomas lineales.
testosterona Hormona esteroidea producida por los testículos.
timina Pirimidina que se encuentra en el ADN emparejada con adenina.
titina Proteína grande que actúa como resorte para mantener a los filamentos de miosina centrados en el sarcómero muscular.
tomografía electrónica Un método empleado para generar imágenes tridimensionales mediante el análisis informático de múltiples imágenes bidimensionales obtenidas por microscopia electrónica.
topoisomerasa Enzima que cataliza la rotura reversible y reunificación de las hebras de ADN.
totipotencia Capacidad de dar lugar a cualquiera de los tres tipos de células de los tejidos y órganos adultos.
traducción Síntesis de una cadena polipeptídica a partir de un molde de ARNm.
traducción *in vitro* Síntesis proteica en un extracto libre de células.
transcitosis Clasificación y transporte de proteínas a diferentes dominios de la membrana plasmática después de una endocitosis.
transcripción Síntesis de una molécula de ARN a partir de un molde de ADN.
transcripción inversa ADN polimerasa que usa un molde de ARN.
transdiferenciación Diferenciación de un tipo de célula somática en otro tipo celular diferenciado.
transducción intracelular de señales Cadena de reacciones que transmiten señales químicas desde la superficie celular a sus objetivos intracelulares.
transducina Proteína G que estimula la GMPc fosforidesterasa, al ser activada por rodopsina.
transfección Introducción de un gen extraño en células eucariotas.
transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) Un método empleado para estudiar interacciones proteicas en el interior de células vivas.
transferencia génica Introducción de un ADN extraño en el interior de una célula.
transferencia Northern Método en el que los ARNm son separados mediante una electroforesis en gel y detectados por hibridación con sondas específicas.
transferencia nuclear de células somáticas El procedimiento básico de clonación animal en el que el núcleo de una célula somática adulta es transferido a un óvulo enucleado.
transferencia Southern Método en el que se emplean sondas radioactivas para detectar fragmentos específicos de ADN que han sido separados por electroforesis en gel.
transferencia Western Ver Inmunotinción.
transformación Transferencia de ADN entre bacterias genéticamente distintas. Véase también transformación celular.
transformación celular Conversión de células normales en células tumorales en cultivo.
translocón Canal de membrana a través del cual se transportan cadenas de polipéptidos al interior del retículo endoplásmico.
transportadores ABC Un miembro de la gran familia de proteínas de transporte de membrana caracterizadas por presentar un dominio de unión de ATP altamente conservado.
transporte activo Transporte de moléculas en una dirección energéticamente desfavorable, a través de la membrana, acoplado a la hidrólisis de ATP o a otra fuente de energía.
transporte pasivo Transporte de moléculas a través de la membrana en una dirección energéticamente favorable.
transposición Movimiento de las secuencias de ADN por todo el genoma.
transposón Secuencia de ADN que puede migrar a diferentes posiciones dentro del genoma.
transposón de ADN Elemento transponible que se mueven mediante intermediarios de ADN.
Trasplante de células madre hematopoyéticas Procedimiento clínico en el que se utiliza el trasplante de células madre hematopoyéticas como tratamiento del cáncer y enfermedades del sistema hematopoyético.
trasplante de médula ósea Un procedimiento clínico en el que el trasplante de células madre de la médula ósea se emplea en el tratamiento de cáncer y otras patologías del sistema hematopoyético.
triacilglicerol Tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol.
tromboxano Eicosanoide que participa en la coagulación sanguínea.
tropomiosina Proteína fibrosa que se une a los filamentos de actina y que regula la contracción mediante el bloqueo de la interacción entre actina y miosina.
troponina Complejo de proteínas que se une a los filamentos de actina y regula la contracción del músculo esquelético.
tubulina Proteína citoesquelética que polimeriza para formar microtúbulos.
tumor Cualquier proliferación anormal de las células.
tumor benigno Tumor que permanece confinado en su sitio de origen.
tumor maligno Tumor que invade un tejido normal y se extiende por todo el cuerpo.
twinfilina Una proteína de unión a la actina que estimula el ensamblaje de monómeros de actina en filamentos.

ubiquinona Véase coenzima Q.
ubiquitina Proteína altamente conservada que actúa como marcador para conducir a otras proteínas celulares a una rápida degradación.
ultracentrífuga Centrífuga que rota las muestras a altas velocidades.
unión adherente Región de adhesión célula-célula mediante la cual el citoesqueleto de actina se ancla a la membrana plasmática.
unión de tipo gap Canal de membrana plasmática que forma una conexión citoplasmática directa entre células adyacentes.
unión estrecha Red continua de hebras proteicas alrededor del perímetro de las células epiteliales, sellando el espacio entre las células y formando una barrera entre los dominios apical y basolateral.
unión Holliday Intermediario central en la recombinación, constituido por una estructura de hebras cruzadas formada

por emparejamiento de bases homólogas entre las hebras de dos moléculas de ADN.

uniporte Transporte de una única molécula a través de una membrana.

uracilo Pirimidina que se encuentra en el ARN y que se empareja con adenina.

vacuola Gran saco rodeado por una membrana en el citoplasma de las células eucariotas. En las células vegetales, la función de las vacuolas es almacenar nutrientes y productos de desecho, degradar macromoléculas y mantener la presión de turgencia.

vector Molécula de ADN empleada para dirigir la replicación de un fragmento de ADN clonado en el interior de una célula hospedadora.

vector de expresión Vector empleado para dirigir la expresión de un fragmento de ADN clonado en una célula hospedadora.

vesícula del Golgi Compartimentos del aparato de Golgi en el que tienen lugar la mayoría de las actividades metabólicas.

vesícula revestida de clatrina Vesícula de transporte tapizada con clatrina.

vesícula revestida de COP Vesícula de transporte revestida de proteínas distintas de la clatrina (COP indica *coat protein*).

vesícula secretora Saco rodeado por una membrana que transportan proteínas desde el aparato de Golgi a la superficie celular.

vesícula sináptica Vesícula secretora que libera neurotransmisores a una sinapsis.

vía JAK/STAT Vía de señalización en la que los factores de transcripción STAT son activados como resultado de la fosforilación por miembros de la familia JAK de proteína quinasas.

vía secretora Movimiento de proteínas secretadas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, después, en el interior de vesículas secretoras, a la superficie celular.

villina Principal proteína formadora de haces de actina en las microvellosidades intestinales.

vimblastina Fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos.

vimentina Proteína de los filamentos intermedios encontrada en una diversidad de tipos celulares.

vincristina Fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos.

vinculina Proteína que media la asociación de filamentos de actina con integrinas en las adhesiones focales.

virus de Epstein-Barr Herpesvirus humano que causa los linfomas de células B.

virus de la hepatitis B Miembro de una familia de virus de ADN que infectan a las células del hígado y pueden desencadenar el desarrollo de cáncer hepático.

virus de la hepatitis C Miembro de una familia de virus de ARN que infectan células hepáticas y pueden desencadenar el desarrollo de cáncer hepático.

virus de los simios 40 (SV40) Virus tumoral de ADN ampliamente estudiado.

virus del sarcoma de Rous (RSV) Retrovirus altamente transformante, donde se identificó el primer oncogén.

virus tumoral Virus capaz de causar un cáncer en animales o humanos.

vitamina D_3 Vitamina que regula el metabolismo del calcio y el crecimiento óseo estimulando la actividad de un miembro de la superfamilia de receptores nucleares.

Wnt Molécula secretada de señalización que estimula una vía que regula el destino celular durante el desarrollo embrionario.

Xenopus laevis Rana africana empleada como sistema modelo en biología experimental.

zigoteno Estadio de meiosis I donde los cromosomas homólogos llegan a estar íntimamente asociados.

zigoto Óvulo fecundado.

zona señalizadora Determinante de reconocimiento formado por el plegamiento tridimensional de una cadena polipeptídica.